

# **KVANTITATIIVINEN KLOSTRIDI- JA HIIVAMÄÄRITYS SÄILÖ- REHUSTA qPCR-MENETELMÄLLÄ**

Emilia König  
Maisterintutkielma  
Helsingin yliopisto  
Maataloustieteiden osasto  
Kotieläinten ravitsemustiede  
2019

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos — Institution — Department Maataloustieteiden osasto	
Tekijä — Författare — Author Emilia König			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Kvantitatiivinen klostridi- ja hiivamääritys säilörehusta qPCR-menetelmällä			
Oppiaine — Läroämne — Subject Kotieläinten ravitsemustiede			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterintutkielma		Aika — Datum — Month and year Toukokuu 2019	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages s. 63
<p>Tiivistelmä — Referat — Abstract</p> <p>Tuotosseurannassa olevien lehmien säilörehunkulutuksen osuus rehujen kokonaiskulutuksesta oli Suomessa 2018 51 % kuiva-aineesta. Rehussa esiintyy haittamikrobeja, joista klostridit aiheuttavat ongelmia meijerissä juustojen valmistuksessa ja hiivat vaikuttavat rehun aerobiseen pilaantumiseen ja tuottavat rehuun etanolia, joka aiheuttaa suuria kuiva-ainetappioita. Perinteisesti rehun mikrobipitoisuuksia on määritetty laboratoriossa kasvatusalustoilla, mutta PCR-menetelmät tuovat uudenlaista nopeutta ja herkkyyttä säilörehun mikrobitutkimukseen.</p> <p>Työn tavoitteena oli testata ja kehittää PCR:ään perustuva menetelmä haittamikrobien määrittämiseksi säilörehunäytteistä. Lisäksi tavoitteena oli spesifisesti tunnistaa ja kvantitatiivisesti määrittää neljä klostridilajia sekä yksi hiivalaji säilöntäkokeen näytteistä.</p> <p>Työn aluksi tehtiin kirjallisuuskatsaus ja tietokantahaku säilörehun sisältämistä haittamikrobeista. Hakutulosten perusteella valittiin seitsemän alukeparia, joista kolme oli yleisalukepareja ja neljä lajispesifisiä alukepareja. Näiden alukkeiden käyttökelpoisuutta testattiin rehu-, juusto- ja hiivanäytteillä laboratoriossa geelielektroforeesilla ja qPCR:llä. Lisäksi säilöttiin valkolupiini-kevätevehnäseosta ilman säilöntäainetta, muurahaishapolla (2, 4 tai 6 l/t tuoretta rehua) sekä natriumnitriitin (900 g/t) -ja heksamiinin seoksella (heksamiinia 0, 300 tai 600 g/t tuoretta rehua) kolmeen laboratoriosiiloon/käsittely. Säilöntäkokeen raaka-aine- ja säilörehunäytteistä tehtiin kemialliset laatuanalyysit ja määritettiin qPCR:llä pitoisuudet haittamikrobeille <i>Clostridium tyrobutyricum</i>, <i>C. butyricum</i>, <i>C. sporogenes</i>, <i>C. perfringens</i> ja <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Mikrobeja löytyi näytteistä runsaasti. Valituista alukkeista kaksi yleisalukeparia olisi soveltunut kvantitointiin agarosigeeliltä ja <i>S. cerevisiae</i> alukepari osoittautui toimivaksi qPCR:llä. Klostrideja löytyi säilörehunäytteistä yllättävän vähän verrattuna näytteiden sisältämään suureen määrään mikrobi-DNA:ta. Klostrideja/itiöitä löytyi ainoastaan viidestä muurahaishapolla säilötystä koesiilosta, mutta voi happea löytyi useammasta siilosta. Mahdollisia syitä vähäisille klostridipitoisuuksille voivat olla muurahaishapon vaikutus mikrobipopulaatioon, vähäinen maaperäkontaminaatio niiton ja rehun keräyksen yhteydessä, lupiinin sisältämät PCR-inhibiittorit, rehun nitraattipitoisuus ja muiden mikrobien aktiiviteetti. Hiivapitoisuudet olivat rehussa suuret. Rehun etanolipitoisuudet olivat pienet verrattuna hiivapitoisuuksiin. Mahdollisesti hiivoilla oli liian vähän happea käytettävissä.</p> <p>PCR-menetelmiä voidaan hyvin käyttää tarkentamaan ja tukemaan rehusta tehtyjä kemiallisia analyysejä. Yksin kemiallisen analyysin perusteella ei voida tehdä pitkäjänteisiä johtopäätöksiä rehun mikrobipitoisuudesta. Liian yksityiskohtainen mikrobikvantifointi voi tuoda ristiriitoja ja ongelmia tulkintaan. Sukuspesifiset tai vielä laajempia taksoneja tunnistavat alukkeet voivat olla lajispesifisiä alukkeita käytännöllisempiä.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Säilörehumikrobit, säilörehun laatu, kvantitatiivinen PCR, klostridit, hiiva			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Maataloustieteiden osasto ja Viikin kampuskirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Yliopistonlehtorit Kari Elo ja Seija Jaakkola			

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Department of Agricultural Sciences	
Tekijä — Författare — Author Emilia König			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Kvantitatiivinen klostridi- ja hiivamääritys säilörehusta qPCR-menetelmällä			
Oppiaine — Läroämne — Subject Animal Nutrition			
Työn laji — Arbetets art — Level Master's thesis		Aika — Datum — Month and year May 2019	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages p. 63
<p>Tiivistelmä — Referat — Abstract</p> <p>The percentage of silage in total dry matter consumption of cows belonging to milk recording in Finland was 51 % in 2018. Harmful microbes can be found in feed. Of these microbes' clostridia cause problems in cheese production in dairies and yeasts affect the aerobic deterioration of silage and produce ethanol, which causes great dry matter losses. Feed microbe concentrations have traditionally been determined by cultivating, but PCR methods bring novel rapidity and sensitivity to silage microbe research.</p> <p>The aim of this study was to test and develop a PCR based method to detect harmful microbes in silage samples. An additional aim was to specifically identify and quantify four clostridia species and one yeast species from samples of a silage trial.</p> <p>First, a literature review and a database search on harmful microbes in silage were conducted. Based on the results, seven primer pairs were selected, of which three were general primer pairs and four species-specific primer pairs. The usefulness of these primers was tested on silage, cheese and yeast samples in laboratory conditions with gel electrophoresis and qPCR. Additionally, was a white lupin-spring wheat mixture ensiled without additive, with formic acid (2, 4 or 6 l/t fresh matter) and sodium nitrite (900 g/t fresh matter) -hexamine (hexamine 0, 300 or 600 g/t fresh matter) in three laboratory silos/treatment. A chemical quality analysis and quantification of harmful bacteria with qPCR were conducted on pre-ensiling forage and silage samples for <i>Clostridium tyrobutyricum</i>, <i>C. butyricum</i>, <i>C. sporogenes</i>, <i>C. perfringens</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Microbes were found in abundance. From the chosen primer pairs, two general primer pairs would have been suited for quantification on agarose gel and <i>S. cerevisiae</i> primers proved to be suitable for qPCR. Compared to the amount of microbe DNA, surprisingly few clostridia were found in the samples. Clostridia/spores were found only in five silos ensiled with formic acid. Butyric acid was found in more silos. Possible explanations for the small amounts of clostridia found, might be the effect of formic acid on microbe populations, minor soil contamination while mowing and collecting the forage, PCR-inhibitors in lupin, the nitrate concentration in the feed, and activity of other microbes. Yeast concentrations in the samples were high. Ethanol concentrations were small compared to yeast concentrations. There might have been too little oxygen available for the yeast.</p> <p>PCR-methods can be used to specify and support chemical analyses from silage. Conclusions on microbe concentrations in silage cannot be solely based on chemical analyses. Furthermore, a too specific microbe quantification might raise contradictions and problems in the interpretation of results. Primers that are genus's specific or recognize even broader taxon might be more functional than species-specific primers.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Silage microbes, silage quality, quantitative PCR, clostridia, yeast			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Department of Agricultural Sciences and Viikki Campus Library			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information University Lecturers Kari Elo and Seija Jaakkola			

## Sisällys

<b>1. Johdanto</b>	5
<b>2. Kirjallisuuskatsaus</b>	7
<b>2.1 qPCR-menetelmä</b>	7
2.1.1 qPCR-menetelmä	7
2.1.2 Alukkeiden valinta	8
2.1.3 DNA-eristys	9
2.1.4 qPCR-ajo	10
2.1.5 Tulosten kvantitatiivinen tulkinta	10
<b>2.2 Klostridit ja niiden vaikutus säilörehussa</b>	11
<b>2.3 Hiivat ja niiden vaikutus säilörehussa</b>	14
<b>2.4 qPCR-menetelmän sopivuus ja käyttömahdollisuudet     säilörehututkimuksessa</b>	15
<b>3. Tutkimuksen tavoitteet</b>	17
<b>4. Aineisto ja menetelmät</b>	17
<b>4.1 Hiivojen ja homeiden testaus laboratoriossa</b>	17
4.1.1 Laboratoriotestauksen esivalmistelut	17
4.1.2 Alukesekvenssien spesifisyyden tarkistus ja laatutestaus	17
4.1.3 Alukkeiden sekvenssilinjaus	18
4.1.4 DNA-näytteet alukkeiden testaukseen	19
4.1.5 Alukkeiden PCR-testaus	21
4.1.6 Spesifisyyden tarkistus geielektroforeesilla	23
<b>4.2 Säilörehu ja käsittelyt</b>	24
<b>4.3 Näytteiden otto ja kemiallinen analyysi</b>	25
<b>4.4 Klostridien ja hiivan analyysi qPCR:llä</b>	25
<b>4.5 Laskut ja tilastolliset käsittelyt</b>	28
<b>5. Tulokset</b>	29
<b>5.1 Hiivojen ja homeiden testaus laboratoriossa</b>	29
<b>5.2 Klostridien ja hiivan määrittäminen qPCR:llä säilöntäkokeen näytteistä</b>	38
<b>6. Tulosten tarkastelu</b>	44
<b>6.1 Hiivojen ja homeiden testaus laboratoriossa</b>	44
<b>6.2 Klostridien ja hiivan määrittäminen qPCR:llä säilöntäkokeen näytteistä</b>	46
<b>7. Johtopäätökset</b>	49
<b>8. Lähteet</b>	50
<b>9. Liitteet</b>	56

## 1. Johdanto

Viljelykasveista hapettomissa oloissa käymisen avulla tehtyä rehua kutsutaan säilörehuksi (Wilkinson ym. 2003). Suomalaisen lypsykarjan ruokinnassa säilörehu on tärkeässä asemassa. Lyhyestä laidunnuskaudesta johtuen, vain alle kolmannes lypsylehmien rehun kokonaisenergian saannista voidaan kattaa laidunrehulla (Huhtanen ym. 2013). Näin ollen noin 50–75 % lypsykarjan ravinnosta muodostuu säilörehusta (Driehuis 2013). Tuotosseurannassa olevien lehmien säilörehun kulutus oli Suomessa vuonna 2018 51 % kuiva-aineesta (Huhtamäki 19.3.2019).

Valkolupiini (*Lupinus albus*) kuuluu palkokasveihin ja sopii hyvin käytettäväksi palkokasvisäilörehuna. Valkolupiinia käytetään ylläpitämään viljelyn monimuotoisuutta ja se voi lajikkeesta ja niitoista riippuen saavuttaa 6500 kg/ha kuiva-aineen (ka) satotason (Azo ym. 2012). Borreani ym. (2009) totesivat valkolupiinin olevan vaikeasti säilöttävä, koska sillä on korkea puskurikapasiteetti ja pieni vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus. Nämä johtavat helposti klostridien dominoimaan käymiseen, jos rehua ei esikuivateta ja/tai käsitellä säilöntäaineilla (Borreani ym. 2009).

Pahlow ym. (2003) kuvaavat klostridit itiöitä muodostaviksi ja pääosin voihappona tuottaviksi bakteereiksi. Klostridit ovat ehdottomia anaerobeja, mutta niiden hapensietokyvyssä on kuitenkin paljon vaihtelua. Säilörehusta usein eristettyjä sakkarolyttisiä klostrideja ovat muun muassa *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens* ja *Clostridium sporogenes*, joista viimeinen on myös proteolyttinen bakteeri (Pahlow ym. 2003).

Klostridien itiöt pääsevät itämään, kun säilörehun hyvälaatuinen käyminen on epäonnistunut rehun ollessa märkää tai kun pH:n lasku ei ole ollut tarpeeksi nopea (Julien ym. 2008). Meijereissä klostridit aiheuttavat ongelmia juustojen valmistuksessa, kuten halkeamia ja epämääräisten reikien muodostumista kovissa ja puolikovissa juustoissa, kuten esimerkiksi parmesaanissa, edamissa ja goudassa (Klijn ym. 1995, Pahlow ym. 2003, Cremonesi ym. 2012). Maidosta juustoon päätyvät klostridi-itiöt ovat yleensä peräisin lypsykarjan rehusta (Cremonesi ym. 2012).

Wilkinson ja Muck (2018) arvioivat säilörehun säilönnän vaikeutuvan tulevaisuudessa, kun ilmastomuutos tuo mukanaan vaihtelevat olosuhteet ja lämpötilan nousun. Käymisen siiloissa voi alkuun nopeutua, mutta kun lämpötilat nousevat yli maitohappobakteerien 30 asteen optimilämpötilan, hidastuu sokereiden fermentaatio (Wilkinson ja Muck 2018). Klostrideilla taas on korkea optimilämpötila ja Wilkinson ja Muck (2018) pelkäävät näin voi happokäymisestä tulevan hallitseva käymismuoto säilörehussa.

Pahlowin ym. (2003) mukaan hiivat ovat eukaryoottisia, heterotroofisia mikro-organismeja, jotka kasvavat yleensä yksittäisinä soluina. Hiivat ovat suuressa roolissa säilörehun aerobisessa pilaantumisessa. *Saccharomyces cerevisiae* tuottaa etanolia aerobisissa oloissa ja pystyy lisääntymään jopa täysin anaerobeissa oloissa. *S. cerevisiae* on fermentatiivinen, mutta ei käytä laktaattia hyväkseen (Pahlow ym. 2003).

Hafner ym. (2018) totesivat säilörehussa esiintyvistä haihtuvista orgaanisista yhdisteistä hiivojen tuottaman etanolin todennäköisesti ilman laadun kannalta kaikkein tärkeimmäksi. Säilörehun tiivistyksen epäonnistuessa voi 12 tunnin aikana haihtua jopa 80 % etanolin kokonaismassasta rehussa (Hafner ym. 2018). *S. cerevisiae* omaa korkean fermentaatiopotentiaalin ja se fermentoi hapettomissa oloissa sokereita etanoliksi ja hiilidioksidiksi, vähentäen näin maitohappokäymiseen saatavilla olevia sokereita (Hafner ym. 2018).

Polymeraasiketjureaktio (PCR) kehitettiin 1980-luvulla analysoimaan ja monistamaan DNA:ta (Saiki, ym. 1985). Viime vuosikymmeninä on kehitetty lukuisia uusia PCR:ään perustuvia menetelmiä (Postollec ym. 2011), joista erityisesti kvantitatiivista PCR:ää (qPCR) käytetään nykyään mikrobien löytämiseen, tunnistamiseen (Masco ym. 2007, Le Dréan ym. 2010) ja mikrobien määrän arvioimiseen (Postollec ym. 2011). PCR-menetelmät ovat löytäneet myös tiensä säilörehututkimukseen. Ne soveltuvat nopeina ja herkkinä menetelminä hyvin sellaisten haittamikrobien tunnistukseen ja seurantaan, joiden perinteinen kasvatus laboratoriossa on ollut haasteellista (Nair ym. 2018). Näiden haittamikrobien spesifinen tunnistus ja kvantifiointi voi auttaa estämään niiden esiintymisen säilörehussa (McAllister ym. 2018) ja näin estämään niiden pääsyn maitoon ja ruokaketjuun (Nair ym. 2018).

## 2. Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 qPCR-menetelmä

#### 2.1.1 qPCR-menetelmä

PCR on tekniikka, jossa ennalta määritetty jakso DNA:ta monistetaan useita kertoja käyttäen apuna polymeraasientsyymiä (Brown 2008). DNA:n kaikki alueet ovat monistettavissa PCR:llä, kunhan monistettavan kohdan alku- ja loppupään sekvenssit ovat tiedossa. Monistettavan kohdan molempien DNA-juosteiden alku- ja loppupäähän liittyy yksi useamman nukleotidin pituinen oligonukleotidi. Nämä oligonukleotidit toimivat juosteiden DNA-synteesin alukkeina ja rajaavat DNA:sta monistettavan alueen (Brown 2008).

Kvantitatiivinen PCR toimii kuten perinteinen PCR, mutta mahdollistaa nukleiinihappojen (Gibson ym. 1996, Bustin ym. 2009), esimerkiksi DNA:n (Breitmaier ja Jung 1995), määrän mittauksen hyvin erilaisista näytteistä (Bustin ym. 2009). Määrän mittaaminen perustuu näihin nukleiinihappoihin liitettyjen molekyylien fluoresenssiin (Higuchi ym. 1992, Wittwer, ym. 1997, Bustin ym. 2009). Näytteitä voidaan kvantifioida suhteellisesti tai absoluuttisesti (Bustin 2000). Suhteellisessa kvantifioinnissa verrataan analysoitavaa näytettä vertailunäytteeseen, jonka nukleiinihappojen pitoisuus on tiedossa, ja mitataan, onko nukleiinihappoja analysoitavassa näytteessä enemmän vai vähemmän (Bustin 2000). Absoluuttinen kvantifiointi sen sijaan mahdollistaa näytteestä tarkan kopioluvun määrittämisen, koska käytetään standardinäytteitä, joiden DNA:n määrä tunnetaan (Bustin 2000).

Bustinin ym. (2009) mukaan qPCR on mikrobien viljelyä helpompi, yksinkertaisempi, nopeampi, spesifisempi ja herkempi työkalu mikrobien tunnistuksessa ja määrittämisessä. Kvantitatiivisen PCR:n kaksi suosituinta menetelmää perustuvat joko hydrolyysikoettiin, tai DNA:han sitoutuvaan väriaineeseen (Wittwer ym. 1997, Postollec ym. 2011). Hydrolyysikoetin lisää monistumisen spesifisyyttä, sillä myös koetin vaatii tietyn vastinsekvenssin, jotta se voi kiinnittyä DNA:han (Tuomi ym. 2010). Suuremman spesifisyyden lisäksi koettimella mahdollistetaan useampien kohdegeenien monistuminen samassa reaktiossa (Gibson ym. 1996, Postollec ym. 2011). Väriainepohjainen menetelmä on

puolestaan halvempi (Tuomi ym. 2010) ja soveltuu hyvin rutiinianalyyseihin, joissa monistetaan yhdessä reaktiossa vain yhtä DNA-jaksoa (Postollec ym. 2011).

### 2.1.2 Alukkeiden valinta

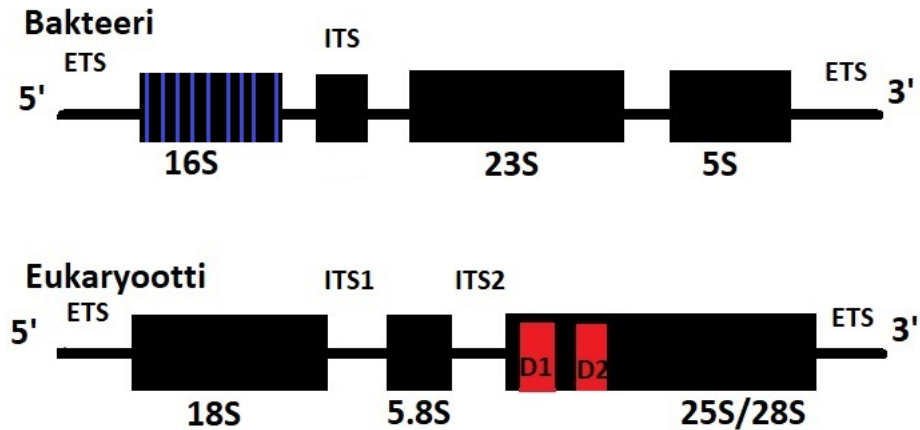
DNA-alukkeiden sekvenssin valinta on erinomaisen tärkeää, koska huonot alukkeet voivat johtaa epäspesifisyyteen, virhemonistumisiin ja vääristymiin analyyseissä (Nair ym. 2018, Brown 2008). Bokulich ja Mills (2012) toteavat alukkeiden valinnan yleensä perustuvan joko paljon vaihtelua sisältävään alueeseen tai hyvin konservoituneeseen alueeseen. Konservoituneet alueet auttavat luokittelemaan mikrobin pääjaksoon ja määrittäminen voi tarkentua lajitasolle suuresti vaihtelevien alueiden perusteella (Yarza ym. 2014). Monistettavan DNA-jakson tulisi olla sopivan lyhyt, jotta tehokas monistuminen ja täsmälliset tulokset olisivat taattuina (Bokulich ja Mills 2012) ja mahdolliset koeongelmat pysyisivät vähäisinä (Bustin ym. 2009).

McAllisterin ym. (2018) mukaan bakteerilajien identifiointiin ja kantojen havaitsemiseen on laajasti käytetty sekä 16S- että 23S-ribosomaalista RNA:ta (rRNA) koodaavaa geeniä (kuva 1). Pientä ribosomaalista alayksikköä koodaava 16S-rRNA sisältää sekä lajien välillä hyvin vaihtelevia alueita että hyvin konservoituneita alueita (Yarza ym. 2014), jotka mahdollistavat jopa lähisukulaiskantojen erotteluun (McAllister ym. 2018). Hiivojen ja homeiden tapauksessa tunnistukseen käytetään McAllisterin ym. (2018) mukaan yleensä 18S- tai sisäisen transkriptoidun välijakson (ITS) alueita. On myös mahdollista suunnitella useamman alueen kattavan alukkeen tarkempaa tunnistusta varten, esimerkiksi ITS- ja D1/D2-alueet sisältävä aluke (McAllister ym. 2018).

Erityisesti qPCR mahdollistaa valittujen mikrobien kvantifikaation näytteistä ja niiden tunnistus on mahdollista myös hyvin pienillä määrillä mikrobi-DNA:ta (Muck 2013). Monistettavan kohteen kopiomäärä voi vaikuttaa qPCR-menetelmään vinouttamalla kvantitatiivisia arvioita (Bokulich ja Mills 2012). Geenikopioiden lukumäärä voi vaihdella bakteereilla 1 ja 15 kopion välillä, joten kopiomäärän ei voida olettaa vastaavan suoraan lukumääräisesti samaa määrää bakteereja. Klostrideilla 16S -rRNA-geenin kopioiden lukumäärä vaihtelee 8 ja 15 kopion välillä (Stoddard ym. 2015). Kvantifioinnissa tämä tulee ottaa huomioon. Absoluuttisten kopioiden lukumäärät saadaan ajojen



tuloksista, mutta solujen kopiolukumäärien vaihtelusta johtuen tästä ei voida päätellä suoraan absoluuttista solulukumäärää.



Kuva 1. PCR-kohdealueet spesifiseen tunnistukseen (McAllister ym. 2018).

### 2.1.3 DNA-eristys

Ensimmäinen askel analyysiprosessissa on nukleiinihappojen eristäminen. Näytteen on oltava korkealaatuinen, jotta siitä voidaan eristää korkealaatuista DNA:ta (Bokulich ja Mills 2012, McAllister ym. 2018). Lisäksi näytteen laatu on tärkeä kokeen toistettavuudelle. Korkealaatuista DNA:ta on nykyään helppo eristää, mikä mahdollistaa hyvän kvantitatiivisen tuloksen (Heid ym. 1996, Postollec ym. 2011). Eristykseen on tarjolla useita kaupallisia eristyskittejä (Nair ym. 2018). Kvantitatiivisen PCR:n käyttöä rutiinitutkimuksissa voidaan helpottaa automatisoimalla sekä nukleiinihappojen eristys että qPCR-valmistelut (Postollec ym. 2011).

Eristettäessä DNA:ta on otettava huomioon, että näyte saattaa sisältää orgaanisia tai epäorgaanisia aineita, jotka voivat haitata DNA-polymeraasin toimintaa PCR:ssä (McAllister ym. 2018). Esimerkkejä PCR-inhibiittoreista ovat muun muassa polysakkaridit, proteaasit, fenolit ja tanniinit. Useimmiten inhibiittorien vaikutusta voidaan vähentää tai kokonaan estää käyttämällä esimerkiksi eristyskittien sisältämää inhibiittorin poisto -kolonnia (McAllister ym. 2018).

#### 2.1.4 qPCR-ajo

Yksi qPCR-ajo koostuu useista peräkkäisistä amplifikaatio- eli monistussykleistä (Postollec ym. 2011). Syklit toistavat samaa kaavaa ja syklejä on yleensä 25–30 per ajo (Brown 2008). Yksi sykli koostuu kolmesta vaiheesta (Postollec ym. 2011), jotka ovat denaturaatiovaihe, liittymisvaihe ja ekstensiovaihe (Brown 2008). Denaturaatiovaiheessa DNA:n nukleotidien väliset sidokset katkaistaan ja kaksijuosteinen DNA muuttuu yksijuosteiseksi DNA:ksi lämmittämällä näytteet 94 °C:een. Yksijuosteista DNA:ta käytetään liittymisvaiheessa templaattina ja alukkeet kiinnittyvät juosteisiin. Kiinnittymistä varten lämpötila lasketaan 60 °C:een. Ekstensiovaiheessa lämpötila nostetaan noin 74 °C:een. Tämä on useimmille DNA-polymeraasientsyymeille toiminnan kannalta optimaalinen lämpötila, jossa ne syntetisoivat alukkeiden rajaamalle alueelle uuden komplementaarijuosteen. Näiden toistuvien syklien lopputulemana saadaan ajon jälkeen useita satoja miljoonia kopioita valitusta DNA:n kohdejaksosta (Brown 2008).

Tutkimuksessa käytetty qPCR-menetelmä perustuu DNA:han sitoutuvaan fluoresoivaan väriin. SYBR Green I on yleisimmin DNA:n värjäykseen käytetty fluoresoiva väri (Postollec ym. 2011). Väriä voidaan käyttää useilla alukkeilla, koska se ei ole kohdeskevenssispesifinen. Tuloksien spesifisyys voidaan vahvistaa muun muassa ajotulosten sulamiskäyräanalyysillä (Postollec ym. 2011), tai varmistamalla monistuneiden tuotteiden koko elektroforeesilla.

#### 2.1.5 Tulosten kvantitatiivinen tulkinta

Kvantitatiivisella PCR:llä voidaan määrittää mikrobien lukumäärä näytteistä (Postollec ym. 2011). Myös itiöiden DNA voidaan tunnistaa näytteistä. Jokaisella syklillä voidaan mitata fluoresenssia ja näin seurata DNA:n kohdesekvenssin monistumista syklien aikana. Amplifikaatiokäyrä saadaan tarkastelemalla monistettavan DNA:n fluoresenssia syklien lukumäärän funktiona. Edelleen voidaan määrittää kynnysyyskliarvo  $C_q$ .  $C_q$  vastaa sykliä, jonka aikana tarkasteltavana olevan nukleiinihapposekvenssin fluoresenssi on selvästi taustafluoresenssia suurempi. Näin ollen  $C_q$ -arvoa käytetään pohjana absoluuttiselle ja suhteelliselle nukleiinihappojen määrän määrittämiselle (Postollec ym. 2011).

Nukleiinihappojen absoluuttisessa määrittämisessä vertaillaan näytteiden ja standardikäyrän  $C_q$ -arvoja. Monistamalla tunnettu määrä tunnettua DNA-näytettä laaditaan standardikäyrä (Leong ym. 2007, Tuomi ym. 2010, Postollec ym. 2011). Standardien avulla voidaan tutkittaville näytteille laskea kopioiden lukumäärä näytteen massa- tai tilavuusyksikköä kohti (Leong ym. 2007, Dhanasekaran ym. 2010). DNA-sekvenssi, jota käytetään standardikäyrän laatimiseen, on valittava huolella. Näytteiden vertailu standardikäyrään vaatii sekä näytteiltä että standardeilta yhtäläistä monistustehokkuutta (Postollec ym. 2011).

## 2.2 Klostridit ja niiden vaikutus säilörehussa

Klostridit ovat gram-positiivisia, ehdottomia anaerobeja bakteereja, jotka muodostavat itiöitä (Madigan ja Martinko 2009). Klostridit elävät maaperässä anaerobisissa taskuissa (Rammer 1996). Anaerobisia klostriditaskuja voi syntyä myös säilörehuun (Vissers ym. 2007b), kun aerobiset mikrobit kuluttavat hapen loppuun rehussa (Tabacco ym. 2009). Näin rehussa voi esiintyä paikoittain suuria klostridipitoisuuksia (Vissers ym. 2007b). Itiöllä tarkoitetaan bakteerin sisällä syntynyttä erilaistunutta solua, joka on lämpöresistentti, vaikeasti tuhottava ja säilyy pitkiä aikoja lepotilassa. Itiöt mahdollistavat bakteerien selviytymisen myös vaikeissa oloissa, kuten muun muassa ravinnepulassa (Madigan ja Martinko 2009).

Klostridit saavat energiansa käymisestä ja ne voidaan jakaa kahteen ryhmään käyttämiensä käymissubstraattien ja niistä syntyneiden tuotteiden perusteella (Madigan ja Martinko 2009). *Clostridium tyrobutyricum*, *C. butyricum* ja *C. perfringens* ovat säilörehusta eristettyjä sakkarolyyttisiä klostrideja, jotka fermentoivat pääosin orgaanisia happoja ja hiilihydraatteja voihapoksi, hiilidioksidiksi ja vedyksi (Jonsson 1989). Sakkarolyyttisille klostrideille pH 5,0 on sopiva elinympäristö, mutta ne sietävät myös happamampia oloja (Pahlow ym. 2003). *C. tyrobutyricum* sietää happamia oloja hyvin ja kykenee fermentoimaan maitohappoa (Pahlow ym. 2003). Maitohapon fermentoiminen voihapoksi suhteellisen matalassa pH:ssa aiheuttaa vastavaikutuksen säilörehun maitohappokäymiselle ja johtaa rehun pH:n nousuun (Pahlow ym. 2003, Vissers ym. 2007).

*C. sporogenes* luokitellaan säilörehusta eristetyistä klostrideista proteolyyttisiin klostrideihin (Madigan ja Martinko 2009). Proteolyyttiset klostridit toimivat parhaiten, kun pH

on yli 5,0. Samoissa olosuhteissa viihtyvät myös kasvien proteolyttiset entsyymit. Entsyymit vapauttavat aminohappoja klostridien saataville hydrolysoimalla kasvien proteiineja (Pahlow ym. 2003). Proteolyttiset klostridit tuottavat joko ammoniakkia deaminoimalla aminohappoja tai amiineja ja hiilidioksidia dekarboksyloimalla aminohappoja (Jonsson 1989, Pahlow ym. 2003). Proteolyttisten klostridien käymistuotteet aiheuttavat menetyksiä rehuarvossa ja vähentävät syöntiä. Nämä käymistuotteet eivät ole toivottuja korkealaatuisessa säilörehussa (Pahlow ym. 2003).

Yleisesti neutraali pH 7,0–7,4 on klostrideille suotuisin (McDonald ym. 1991). Jonssonin (1989) mukaan säilörehu arvioidaan stabiiliksi, kun sen pH on alle 4,2, koska tämä pH estää klostridien kasvun (Jonsson 1989). Lisäksi klostridien aktiivinen kasvu vaatii kosteat olosuhteet (McDonald ym. 1991) ja kasvu estyy veden aktiivisuuden laskiessa alle 0,94 (Jonsson 1989). Madigan ja Martinkon (2009) mukaan veden aktiivisuudella kuvataan organismin metaboliaa varten vapaana käytettävissä olevaa veden määrää. Veden aktiivisuus vaihtelee 1 ja 0 välillä ja puhtaalla vedellä veden aktiivisuus on 1. Veden ja aktiivisen veden määrää voidaan vähentää muun muassa kuivattamalla (Madigan ja Martinko 2009). Näin ollen rehun suurempi kuiva-ainepitoisuus antaa selektiivisen suojan voihappokäymiseltä (Pahlow ym. 2003) ja yli 350 g/kg kuiva-ainepitoisuus inhiboi klostrideja (Woolford 1984). Toisaalta, rehun ollessa märkää ja veden ollessa vapaasti saatavilla, jopa pH-arvot alle 4,0 eivät estä klostridien kasvua (Woolford 1984).

Pahlowin ym. (2003) mukaan säilörehun arvostelu ja säilönnällisen laadun arviointi perustuvat usein rehun voihappo- ja ammoniakkipitoisuuksiin. Klostridisäilörehussa on usein korkea pH (jopa yli 5 määssä rehussa), vain vähän tai ei lainkaan maitohappoa, suuri voihappopitoisuus (yli 5 g/kg ka), paljon ammoniakkia (yli 120 g NH<sub>3</sub>-N/kg N) ja suuri amiinipitoisuus (Pahlow ym. 2003). Rehun suuri sokeripitoisuus auttaa yleensä maitohappobakteereja laskemaan rehun pH:n tarpeeksi alas, mutta pH:n lasku riippuu rehun puskurikapasiteetista (Pahlow ym. 2003), joka on palkokasveilla korkea (McDonald ym. 1991). König ym. (2019) mittasivat valkolupiinin puskurikapasiteetiksi 703 mEkv/kg kuiva-ainetta. Kevätvehnän puskurikapasiteetti sen sijaan jäi alle 300 mEkv/kg kuiva-ainetta (König ym. 2017).

Klostridien aiheuttama maitohapon käyminen voihapoksi aiheuttaa rehussa jopa 51 % kuiva-ainetappioita, 18 % bruttoenergiatappioita ja vähentää rehun maittavuutta (Muck

2010, Borreani ym. 2018). Voihappopitoisuudet, jotka ylittävät 5 g/kg ka laskevat rehun syöntiä (Rook ym. 1990, Muck 2010). Eläinten syödessä vähemmän säilörehua, syövät ne myös vähemmän kuitua. Pötsin toiminta kärsii liian alhaisesta kuidun syönnistä. Cherney ja Cherney (2003) arvelevat syönnin vähenemisen johtuvan ainakin osittain klostridisäilörehun sisältämien amiinien epämiellyttävästä mausta ja hajusta. Viljelijän tulisi vähentää voihappopitoisen rehun määrää rehuseoksessa, jotta eläinten syönti pysyy tasaisena (Muck 2010). Varsinkin laktation alkuvaiheessa lehmät voivat olla alttiimpia sairastumaan ketoosiin, jos ne syövät voihappopitoista rehua (Muck 2010). Klostridien pitoisuusrajat riippuvat eläintuotannosta ja maidon lopputuotteista. Esimerkiksi Italiassa alueilla, joilla tuotetaan parmesania, ei lehmiä ole lupa ruokkia säilörehulla lainkaan, koska pienetkin klostridipitoisuudet pilaavat juuston (Pahlow ym. 2003). Pahlowin ym. (2003) mukaan klostridikontaminaation tulisi olla alle 100 itiötä/g rehua, jotta säilörehun klostridituotantoa voidaan rajoittaa.

Spoelstran (1983) mukaan nitraattipitoisuudet ovat epäsuorasti yhdistettävissä klostridihäiriöön. Osa klostrideja edeltävistä bakteereista, kuten enterobakteerit, pelkistävät säilörehun ensimmäisinä päivinä nitraattia nitriitiksi tai tuottavat suoraan nitriittiä. Molemmissa tapauksissa syntyvä nitriitti estää klostridien kasvua (Spoelstra 1983, Pahlow ym. 2003). Nitraatin rooli säilörehussa on kuitenkin kaksiosainen. Toisaalta nitraatin pelkistystuotteet nitriitti ja typpioksidit laskevat klostridien aktiivisuutta. Nitraatin pelkistys laskee kuitenkin myös rehun sokeripitoisuutta. Samalla rehun pH nousee, kun neutraaleja typpikaasuja ja ammoniakkia muodostuu. Tämä rehun pH:n laskun hidastuminen voi lopulta johtaa klostridien lisääntymiseen (Spoelstra 1983).

Säilörehussa olevat klostridi-itiöt päätyvät rehun mukana lehmän ruoansulatuskanavaan. Itiöt läpäisevät lehmän vahingoittumattomina ja voivat päätyä lannasta utareisiin ja edelleen maitoon (Vissers ym. 2007b, Driehuis 2013). Säilörehu on maaperän ja parsipehmikkeiden ohella suurin itiölähde (Vissers ym. 2007b). Rehun kontaminaatio maaperäbakteereilla tapahtuu joko jo kasvien kasvun aikana tai rehunteon yhteydessä (Driehuis 2013). Maidon klostridipitoisuuden vähentäminen onnistuu pienentämällä rehun klostridipitoisuutta ja hyvällä lypsyhygienialla (Vissers ym. 2007b).

Rehua on säilötty Suomessa perinteisesti hapolla, sen jälkeen kun A. I. Virtanen totesi 1930-luvulla rehun nopean happamoitumisen (vähintään pH 4:ään) lopettavan

rehukasvien soluhengityksen, proteiinien sekä vitamiinien hajoamisen ja estävän voihaappokäymisen (Virtanen 1933). Happolisän tarkoituksena on estää kaikki mikrobitoiminta rehussa. Alkuun käytetty suolahappo-rikkihappoliuos korvattiin 1960-luvulla muura-haishapolla (Wilkinson ym. 2003). 1960-luvulta lähtien on myös tutkittu natriumnitriitti-heksamiini-yhdistelmää mahdollisena kemiallisena säilöntäaineena (Hellberg 1967). Tämä kemiallinen säilöntäaine estää klostridiiden toimintaa ja vähentää rehun voihaappopitoisuutta (König ym. 2017, König ym. 2019).

### 2.3 Hiivat ja niiden vaikutus säilörehussa

Hiivat ovat yksisoluisia sieniä, jotka ovat muodoltaan yleensä pyöreitä, ovaaleja tai sylinterin muotoisia (Madigan ja Martinko 2009). Hiivat lisääntyvät jakautumalla (emosolusta irtautuu tytärsolu), mutta ne pystyvät myös suvulliseen lisääntymiseen. Madigan ja Martinkon (2009) mukaan hiivasolut ovat bakteerisoluja suurempia ja ne voidaan hyvin erottaa bakteereista mikroskoopin alla kokonsa ja solun sisällä erottuvien soluelinten perusteella. *S. cerevisiaeta* on tutkittu laajalti ja se oli ensimmäinen eukaryootti, jonka genomi sekvensoitiin kokonaan (Madigan ja Martinko 2009).

Hiivoilla on Pahlwin ym. (2003) mukaan tärkeä rooli säilörehun aerobisessa pilaantumisessa. Suurin osa hiivoista on valinnaisesti anaerobeja, eli ne pystyvät sekä hapelliseen hengitykseen että alkoholikäymiseen (Madigan ja Martinko 2009). Useimmat hiivat vaativat tietyn määrän happea toimiakseen ja lopettavat fermentaation ja kasvun, kun happea ei ole saatavilla (Pahlow ym. 2003). Hiivat jaetaan laktaattia käyttäviin ja ei-laktaattia käyttäviin. *S. cerevisiae* ei yleensä käytä maitohappoa (Pahlow ym. 2003), mutta osa *S. cerevisiae* -kannoista voi käyttää myös laktaattia hyväkseen (Duniere ym. 2015, Wang ym. 2018). Se pystyy tuottamaan etanolia ja lisääntymään täysin hapettomissa oloissa (Pahlow ym. 2003). Säilönnän ajan hengissä selvinneet hiivat aloittavat myös todennäköisesti aerobisen pilaantumisen, kun siilo avataan (Pahlow ym. 2003).

Hapettomissa oloissa hiivat voivat muuttaa liukoiset sokerit hiilidioksidiksi ja etanoliksi, tällöin yhdestä glukosimolekyylistä syntyy kaksi etanolimolekyyliä (Rooke ja Hatfield 2003). Etanoli on epämieluisa säilönnän lopputuote ja voi olla myrkyllistä karjalle (Duniere ym. 2015, Wang ym. 2018). Hiilidioksidin tuotanto aiheuttaa suuria kuiva-

ainetappioita (Rooke ja Hatfield 2003). *Saccharomyces*-kannat eivät ole tärkeä tekijä säilörehun pilaantumisessa, mutta kuluttavat säilönnän aikana paljon sokeria (Duniere ym. 2015).

Muckin (2010) mukaan säilörehussa sokerit ja maitohappo ovat tärkeimmät kasvualustat hiivoille. Monet hiivat sietävät noin 3,5 vaiheilla olevia pH-arvoja. Laktaattia käyttävät hiivat nostavat aerobisissa oloissa rehun pH:n ja lämpötilan nopeasti ja mahdollistavat näin muiden (pilaaja)mikrobien kasvun, kun pH on noussut yli 4,5 (Rooke ja Hatfield 2003, Muck 2010). Hiivat voivat kehittyä ja tuottaa suuriakin etanolipitoisuuksia rehuun (>20 g/kg ka), kun säilörehussa on maitohappokäymisen jälkeen suuret määrät jäännös-sokeria (Muck 2010).

#### **2.4 qPCR-menetelmän sopivuus ja käyttömahdollisuudet säilörehututkimuksessa**

Perinteisesti voihappoitiöiden pitoisuus on määritetty laboratoriossa sopivilla kasvatusalustoilla ja näytelaimennoksilla käyttäen todennäköisimmän lukumäärän -menetelmää (*most probable number*) (Morandi ym. 2015). Analyysi kestää tällä menetelmällä monta päivää ja tulokset ovat epävarmoja. Lisäksi menetelmällä ei voida tunnistaa lajeja, vaikka se sopiikin hyvin itiöiden laskemiseen (Morandi ym. 2015). Klostridipitoisuuksia voidaan arvioida myös epäsuorasti rehun voihappopitoisuuden kautta, mikä kertoo vegetatiivisten solujen määrästä, mutta ei paljasta itiöiden määrää (Jonsson 1989). Klostridiitiöt eivät tuota voihappoa (McDonald ym. 1991), mutta rehun pieni voihappopitoisuus ei tarkoita, että rehu olisi klostridivapaata (König ym. 2017). Se saattaa silti sisältää itiöitä, jotka kehittyvät myöhemmässä vaiheessa vegetatiivisiksi soluiksi ja pilaavat rehun tai muita tuotteita ruokaketjussa.

Vegetatiivisten klostridien kasvatus onnistuu laboratoriossa hapettomissa oloissa, mutta tarvitaan suuria klostridipitoisuuksia, ennen kuin niiden aktiviteetti näkyy voihappona (Jonsson 1989). Kasvatus on mahdollista, mutta ongelmallista, mikä tekee kasvatusanalyysistä epätarkan. Organismit, joita halutaan tutkia, voivat olla rehussa aktiivisia, mutta eivät kasvakaan laboratorio-olosuhteissa. Toisaalta rehussa olevat itiöt saattavat herätä vegetatiivisiksi soluiksi kasvatusalustalla. Lisäksi säilörehusta löytyy muitakin mikrobeja, jotka tuottavat klostridien kanssa samoja käymistuotteita, muun muassa jotkin

*Bacillus*-lajit tuottavat voihappoa ja jotkin enterobakteerit ammoniakkia. Nämä mikrobit tuovat tuloksiin lisää epätarkkuutta (Jonsson 1989).

Tieto rehussa kasvavista mikro-organismeista on aikaisemmin rajoittunut laboratorioissa kasvatusalustalla viljeltäviin lajeihin (Muck 2013). Nykyään voidaan tunnistaa rehusta lajeja, jotka eivät kasva laboratorio-oloissa. Säilörehusta eristetään mikrobi-DNA:ta, se monistetaan ja sen perusteella voidaan erotella lajeja (Yarza ym. 2014). PCR-tekniikoilla mikrobien tunnistus ja määrien mittaaminen tuo uudenlaista tarkkuutta säilörehututkimukseen (Muck 2013). Etenkin qPCR:n nopeus ja sen herkkyys sekä spesifisyys, jotka vastaavat perinteistä PCR:ää tai voivat olla jopa tätä parempia, tekevät siitä hyvän vaihtoehdon perinteisille laboratoriokasvatusmenetelmille (Espy ym. 2006).

Säilönnän aikaisten mikrobिताpahtumien määrittämiseen qPCR on arvokas työkalu. Varsinkin mikrobilajeilla, joiden kasvatus tai eri lajikkeiden tunnistus on vaikeaa perinteisillä laboratoriokasvatusmenetelmillä (Nair ym. 2018). Säilörehututkimuksessa qPCR:ää on käytetty toimivana apuna onnistuneesti kuluneiden vuosien aikana. On tutkittu muun muassa rehun luontaisia maitohappobakteereja, mikrobeihin perustuvia säilöntäaineita (ymppejä) ja muiden säilöntäaineiden vaikutusta näihin. Klocke ym. (2006) tutkivat qPCR:llä *Lactobacillus plantarum* -populaatiodynamiikkaa säilönnän aikana ja eri säilöntäaineiden vaikutusta populaatioon. Stevenson ym. (2006) kvantifioivat seitsemän maitohappobakteerilajia qPCR:llä ja tutkivat kaupallisten ymppeiden vaikutusta näihin lajeihin ja säilörehun laatuun. Duniere ym. (2015) tutkivat hiivaympin vaikutusta rehun aerobiseen laatuun, ruokinnalliseen arvoon ja tiettyihin maitohappobakteereihin. Lisäksi on tutkittu myös säilöntäaineiden vaikutusta haittamikrobeihin, kuten klostrideihin ja *S. cerevisiae*en (König ym. 2019).

Vaikka qPCR-pohjaiset menetelmät soveltuvat Nairin ym. (2018) mukaan hyvin säilörehun mikrobitutkimukseen, on niillä yksi suuri haittapuoli: qPCR:llä ei voida sellaisenaan erottaa elävän ja kuolleen solun DNA:ta toisistaan. Bokulichin ja Millsin (2012) mukaan on kuitenkin olemassa tiettyjä DNA:ta sitovia aineita, kuten propidium- ja etidiummonotasidi, joita voidaan lisätä näytteisiin ennen DNA:n eristystä. Nämä aineet sitovat kuolneiden solujen DNA:n ja estävät niiden monistumisen PCR:ssä (Bokulich ja Mills 2012).



### 3. Tutkimuksen tavoitteet

Tutkielman yleistavoitteena oli selvittää kuinka mikrobien DNA:n määriin perustuvia menetelmiä voi käyttää osana säilörehun laadun arviointia. Kirjallisuustutkimuksen perusteella tehtiin yhteenveto säilörehuista tunnistetuista home- ja hiivalajeista ja niiden yleisyydestä. Tutkimuksen tavoitteena oli yhteenvedon perusteella valikoida mikrobiryhmiä ja -lajeja sekä testata ja kehittää niiden avulla PCR:ään perustuvia menetelmiä haittamikrobien määrien mittaamiseksi säilörehunäytteistä. Lisäksi tavoitteena oli spesifisesti tunnistaa ja kvantitatiivisesti määrittää neljä klostridilajia sekä yksi hiivalaji yksittäisen säilöntäkokeen näytteistä ja arvioida onko klostridien määrän ja voihapsen sekä hiivojen määrän ja etanolin välillä yhteyttä.

Tässä tutkielmassa käsitellään kyseisestä säilöntäkokeesta vain näytteiden mikrobianaalyysijä sekä näiden analyysien yhteyttä säilörehujen voihapsen- ja etanolipitoisuuksiin. Muilta osin säilörehujen laatuanalyysit ja säilöntäaineiden vaikutukset jäävät tämän tutkielman ulkopuolelle.

### 4. Aineisto ja menetelmät

#### 4.1 Hiivojen ja homeiden testaus laboratoriossa

##### 4.1.1 Laboratoriotestauksen esivalmistelut

Artikkelitietokannasta haettiin artikkeleita, jotka käsittelevät tutkimusta homeiden (liite 1) ja hiivojen (liite 2) esiintymisestä nurmisäilörehussa. Näissä artikkeleissa yleisimmin esiintyneet lajit valittiin ja tehtiin uusi tietokantahaku. Etsittiin menetelmäartikkeleita, joissa valituille lajeille oli tehty qPCR-tutkimusta ja joista löytyi toimivat alukkeet lajeille.

##### 4.1.2 Alukesekvenssien spesifisyyden tarkistus ja laatutestaus

Alukesekvenssien (liite 3) esiintyvyyttä DNA-sekvenssitietokantojen tunnetuissa genomeissa testattiin *in silico* -tietokannoista NCBI:n (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Nucleotide BLAST:lla (Basic Local

Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Forward (F)- ja reverse (R)-alukkeet tarkistettiin erikseen. Spesifisyyden tarkistamiseksi alukesekvenssit kopioitiin FASTA-muodossa (tietyt kirjaimet edustavat tiettyä nukleotidia) BLAST:n hakuruutuun aluke kerrallaan ja hakutuloksista otettiin talteen tulokset, joiden ”Query cover”- ja ”Ident”-prosentit olivat molemmat sata, mikä merkitsee sataprosenttista lajispesifisyyttä.

BLAST-haun jälkeen suoritettiin alukkeiden laatutestaus Primer Stats -ohjelmalla (Sequence Manipulation Suite: PCR Primer Stats, [http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr\\_primer\\_stats.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html)). Ohjelman hakuruutuun kirjoitettiin molemmat alukkeet FASTA-muodossa. Lisäksi alukkeet nimettiin. Ohjelma kertoo muun muassa alukkeiden kiinnittymislämpötilan. Alukkeen ideaalinen sulamislämpötila on 55–60 °C:tta. Tämä takaa qPCR:ssä paremman toimivuuden ja vähemmän epäspesifisyyttä. Alukkeen yleisten ominaisuuksien lisäksi ohjelma kertoo myös sen PCR-sopivuudesta, käymällä läpi ongelmia, joita PCR-ajossa voi aiheutua, kuten esimerkiksi sisäisten sekundäärirakenteiden (muun muassa hiuspinnien) muodostumisen. Sekundäärirakenteet estävät alukkeita sitoutumasta monistettavaan kohtaan.

#### 4.1.3 Alukkeiden sekvenssilinjaus

Laatutestauksen jälkeen alukkeet sekvenssilinjattiin CLUSTAL-ohjelmalla (CLUSTAL OMEGA, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), jotta saataisiin selville, mistä kohdasta perimää aluke on poimittu. Alukkeen hakunumerolla tai menetelmäartikkeleista löytyvillä tiedoilla (lajinimi ja kohta DNA:sta) haettiin sekvenssilinjausta varten esimerkiksi ENA:sta (European Nucleotide Archive, <https://www.ebi.ac.uk/ena>) kromosomialueen sekvenssi. F- ja R-alukkeet sekä kromosomialueen sekvenssi kirjoitettiin CLUSTAL-ohjelman hakukenttään FASTA-muodossa. Alukesekvenssien aiheuttamat mahdolliset ongelmat tarkistettiin ja hyväksi todetut alukkeet tilattiin kaupalliselta toimittajalta (Metabion International AG, Planegg, Saksa). Testattavaksi laboratorioissa tilattiin seitsemän alukeparia, joista kolme oli yleisiä alukepareja (tunnistavat yleisesti mikrobeja) ja neljä lajispesifisiä alukepareja (taulukko 1). Testattavaksi valittujen alukkeiden sekvenssit, PCR-tuotteen koko sekä kirjallisuusviite on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 1. Testattavaksi otetut alukkeet, niiden tyyppi ja lyhenteet.

Aluke tai laji	Tyyppi	Alukeparin lyhenne
ITS1 ja ITS4	yleinen sienialukepari	ITS1F/ITS4R
E8 ja E1115	yleinen bakteerialukepari	E8F/E1115R
BT1A	yleinen homealukepari	BT1AF/BT1AR
<i>Penicillium roqueforti</i>	spesifinen homealukepari	ProqF/ProqR
<i>Candida albicans</i>	spesifinen hiiva-alukepari	CalbF/CalbR
<i>Geotrichum candidum</i>	spesifinen hiiva-alukepari	GcanF/GcanR
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	spesifinen hiiva-alukepari	ScerF/ScerR

#### 4.1.4 DNA-näytteet alukkeiden testaukseen

Testausta varten eristettiin DNA:ta silminnähden homeisesta rehusta, paalatusta rehusta ja kaupasta ostetusta homejuustosta (Saint Agur, Force et Fondant à la fois, Formage à pâte persillée fabriqué en Velay, 125 g) ja hiivasta (Suomen tuorehiiva, 50 g). Analyysit tehtiin kotieläintieteiden laboratoriossa Helsingin yliopistossa. Jokaista rehunäytettä punnittiin noin 30 grammaa ja näytteeseen lisättiin 200 ml tislattua vettä homogenisointia varten. Näytteet homogenisoitiin tehosekoittimella. Homogeeniset seokset sentrifugoitiin 10 000xg 15 minuuttia huoneenlämmössä. Sentrifuugiputkista kaadettiin nestefaasi pois ja putken pohjalle kertynyt pelletti sekoitettiin. Pelletistä punnittiin noin 200 mg DNA-eristystä varten. DNA-eristys suoritettiin Macherey-Nagel NucleoSpin Soil -kitillä (Macherey-Nagel GmbH und Co KG, Düren, Saksa). Kitin DNA-eristysohjeita seurattiin käyttäen SL1-lyysispuskuria SX-voimistajan kanssa. Eristetty DNA eluoitiin 30 µl:aan SE-puskuria. Eristetystä DNA:sta otettiin erilliseen putkeen 3 µl talteen DNA-konsentraation määrittystä varten (NanoDrop1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Eristetty DNA pakastettiin (-20 °C) eristyksen ja analyysin välillä.

Homejuustosta (pelkkää homekasvustoa) ja hiivasta punnittiin 200 mg näytettä DNA-eristyskitin putkiin ja eristyskitin ohjeen mukaiset ensimmäiset neljä askelta toistettiin kahteen kertaan. Puskurina käytettiin SL1-puskuria ilman SX-voimistajaa ja näytteet eluoitiin 50 µl SE-puskuria ja tästä 3 µl talteen DNA-konsentraation määrittystä varten (NanoDrop1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (taulukko 3). Testinäytteistä tehtiin seuraavat laimennossarjat: laimentamaton, 1:10, 1:100, 1:1000 ja 1:10000.

Laimentamaton näyte oli 45 µl tilavuudessa, josta otettiin 5 µl näytettä ja sekoitettiin 40 µl PCR-laatuista vettä, jotta saadaan 1:10 laimennos. Seuraavaa laimennosta varten otettiin taas 5 µl 1:10 laimennosta, joka sekoitettiin 40 µl PCR-laatuista vettä, jotta saatiin 1:100 laimennos. Tätä jatkettiin vielä kahdesti, jotta saatiin 1:1000 ja 1:10000 laimennokset.

Taulukko 2. Testattavien alukkeiden sekvenssi, PCR-tuotteen koko ja viitetieto.

Alukeparin lyhenne	Sekvenssi	PCR-tuotteen koko (nukleotidia)	Viitetieto
ITS1F/ITS4R	F5'- TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3' R5'- TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'	550-600	Glass ja Donaldson 1995. Applied and Environmental Microbiology 61: 1323-1330. <a href="http://aem.asm.org/content/61/4/1323.abstract?sid=3e092cf9-1273-4e53-93ab-deab6d389bd0">http://aem.asm.org/content/61/4/1323.abstract?sid=3e092cf9-1273-4e53-93ab-deab6d389bd0</a>
E8F/E1115R	F5'- AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3' R5'- AGGGTT-GCGCTCGTTG-3'	1000	Baker ym. 2003. Journal of Microbiological Methods 55: 541-555. <a href="https://core.ac.uk/download/pdf/62632842.pdf">https://core.ac.uk/download/pdf/62632842.pdf</a>
BT1AF/BT1AR	F5'- TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG-3' R5'- GACGA-GATCGTTCATGTT-GAACTC-3'	550	Glass ja Donaldson 1995. Applied and Environmental Microbiology 61: 1323-1330. <a href="http://aem.asm.org/content/61/4/1323.abstract?sid=3e092cf9-1273-4e53-93ab-deab6d389bd0">http://aem.asm.org/content/61/4/1323.abstract?sid=3e092cf9-1273-4e53-93ab-deab6d389bd0</a>
ProqF/ProqR	F5'- ACCCCGAAGTCTGTCTGAAG-3' R5'- ATTTGCTGCGTTCTTCATC-3'	106	Le Dren ym. 2010. International Journal of Food Microbiology 138: 100-107. <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509006655">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509006655</a>
CalbF/CalbR	F5'- CTTGG-TATTTTGCATGTT-GCTCTC-3' R5'- GTCAGAGGC-TATAACACACAG-CAG-3'	(ei mainittu)	Brinkman ym. 2003. Applied and Environmental Microbiology 69: 1775-1782. <a href="http://aem.asm.org/content/69/3/1775.full">http://aem.asm.org/content/69/3/1775.full</a>
GcanF/GcanR	F5'- GATATTTCTTGTGAATTGCAGAAGTGA-3' R5'- TTGAT-TCGAAATTTTA-GAAGAGCAAA-3'	(ei mainittu)	Haugland ym. 1999. Molecular and Cellular Probes 13: 329-340. <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S089085089990258X">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S089085089990258X</a>
ScerF/ScerR	F5'- ATCGAATTTTTGAACGCACATTG-3' R5'- CGCAGA-GAAACCTCTCTTTGGA-3'	175	Hierro ym. 2007. Federation of European Microbiological Societies Yeast Research 7: 1340-1349. <a href="https://academic.oup.com/femsyr/article/7/8/1340/549435">https://academic.oup.com/femsyr/article/7/8/1340/549435</a>

Taulukko 3. DNA-konsentraatiomäärittäminen.

Näyte	Konsentraatio, ng/μl	Absorbanssisuhde, 260nm/280nm
Hiiva1	168,7	1,84
Hiiva2	167,4	1,88
Hiiva3	170,8	1,86
Hiiva4	205,9	1,86
Juusto1	41,7	1,78
Juusto2	39,0	1,83
Juusto3	87,0	1,81
Juusto4	50,6	1,80
Paali1.1	8,7	1,68
Paali1.2	26,6	1,56
Paali1.3	26,2	1,47
Paali1.4	18,3	1,59
Paali2.1	17,6	1,60
Paali2.2	17,7	1,51
Paali2.3	9,0	1,57
Paali2.4	15,5	1,54
Paali3.1	29,2	1,54
Paali3.2	9,1	1,61
Paali3.3	4,4	1,56
Paali3.4	16,4	1,58
Paali5.1	19,2	1,72
Paali5.2	31,7	1,62
Paali8.1	20,6	1,76
Paali8.2	33,9	1,66
Paali12	135,0	1,87
Homerehu13	226,1	1,87
Homerehu14.1	430,9	1,87
Homerehu14.2	51,9	1,87
Homerehu15.1	66,7	1,89
Homerehu15.2	5,3	1,98

#### 4.1.5 Alukkeiden PCR-testaus

Tilatut alukkeet otettiin käyttöön lisäämällä alukkeiden mukana tulleen analyysitodistuksen ohjeiden mukainen määrä PCR-laatuista vettä, jonka jälkeen alukeliuosten konsentraatiot olivat 100 μM. Alukkeista tehtiin välilaimennokset suhteessa 5:100, eli 5 μM F-aluketta ja 5 μM R-aluketta. PCR-testiajojen reaktiivilavuus oli 50 μl, josta 10 μl oli

reaktioliuosta, 1 µl eristettyä DNA:ta ja 39 µl PCR-laatuista vettä. Reaktioliuokset valmistettiin seuraavasti per reaktio: 5 µl 10-kertaista puskuria, 2 µl dNTP:tä (10 mM), 2,5 µl F-aluketta (5 µM/aluke), 2,5 µl R-aluketta (5 µM/aluke) ja 0,5 µl DNA polymeraasia (DreamTaq DNA Polymerase, 5 U/µl, Fisher Scientific Oy, Vantaa). PCR-ohjelma sisälsi 4 minuutin alkudenaturaation 94 °C:ssa ja sen jälkeen 30 sykliä seuraavasti: 1 min 94 °C:ssa, 1 min 54 °C:ssa ja 1 min 72 °C:ssa ("cow54").

Alukkeiden toimivuutta testattiin käyttämällä myös suurempaa alukekonsentraatiota (10 µM/aluke) ja erilaisia alukekonsentraatio/DNA-näytekonsentraatio -suhteita (taulukko 4). ScerF/ScerR-alukeparilla tehdyssä PCR-ajossa reaktion tilavuus oli 20 µl, josta 18 µl oli reaktioliuosta ja 2 µl eristettyä DNA:ta. Reaktioliuos valmistettiin ScerF/ScerR-alukkeille seuraavasti: 2 µl 10-kertaista puskuria, 1 µl dNTP:tä (10 mM), 2 µl F+R-aluke-seosta (5 µM/aluke), 0,4 µl DNA-polymeraasia (DreamTaq DNA Polymerase, 5 U/µl, Fisher Scientific Oy, Vantaa) ja 12,5 µl PCR-laatuista vettä. PCR-ohjelmien erot: 4 minuutin alkudenaturaation 94 °C:ssa ja sen jälkeen 30 sykliä seuraavasti: 1 min 94 °C:ssa, 1 min 58 °C:ssa ja 1 min 72 °C:ssa ("58"); 10 minuutin alkudenaturaation 95 °C:ssa ja sen jälkeen 40 sykliä seuraavasti: 30 s 95 °C:ssa, 30 s 55 °C:ssa ja 30 s 72 °C:ssa ("clo55"); 1 minuutin alkudenaturaation 94 °C:ssa ja sen jälkeen 30 sykliä seuraavasti: 1 min 94 °C:ssa, 1 min 60 °C:ssa ja 1 min 72 °C:ssa ("60"); ja 1 minuutin alkudenaturaation 94 °C:ssa ja sen jälkeen 40 sykliä seuraavasti: 1 min 94 °C:ssa, 1 min 60 °C:ssa ja 1 min 72 °C:ssa ("60\_40sykliä") (taulukko 4). Kaikki taulukon 1 testaukset tehtiin tavallisilla PCR-laitteilla (MJ Research PTC-100, Watertown, MA, USA).

qPCR-ajoa (LightCycler 480, Roche Diagnostics, Mannheim, Saksa) varten laimennettiin DNA-testinäytteitä (juusto2, hiiva4 ja homerehu15.1 eli "säilö"-lyhenteellä myöhemmin) 1:10, 1:100, 1:1000 ja 1:10000, jotka ajettiin kolmena rinnakkaisnäytteenä per testattava alukepari. Testattavat alukkeet olivat ProqF/ProqR, CalbF/CalbR, GcanF/GcanR ja ITS1F/ITS4R ja ScerF/ScerR. Alukeseoksia testattiin kahta eri konsentraatiota qPCR-ajoa varten: 3,5 µl F-aluketta, 3,5 µl R-aluketta ja 63 µl PCR-laatuista vettä, jotta saadaan alukkeiden konsentraatioksi 5 µM/aluke, sekä 1,4 µl F-aluketta, 1,4 µl R-aluketta ja 67,2 µl PCR-laatuista vettä, jotta saadaan alukkeiden konsentraatioksi 2 µM/aluke. Alukeparia ScerF/ScerR testattiin vain 5 µM/aluke konsentraatiolla. Reaktioliuokset olivat 10 µl ja valmistettiin seuraavasti per reaktio: 2,5 µl DNA-näytettä, 1,5 µl PCR-laatuista vettä, 1 µl alukeseosta ja 5 µl reaktioliuosta (Roche's 2x master-mix).

Taulukko 4. Testatut alukelaimennokset, alukkeet, DNA-määrä ja PCR-ohjelma -yhdistelmät.

Alukeparit	Alukelaimennokset	DNA-määrä	PCR-ohjelma
ITS1F/ITS4R	5 µM/aluke	1 µl	”cow54”
E8F/E1115R		1 µl	
ITS1F/ITS4R	5 µM/aluke	2 µl	”58”
BT1AF/BT1AR		2 µl	
ProqF/ProqR	10 µM/aluke	20 µl	”clo55”
CalbF/CalbR		20 µl	
GcanF/GcanR		20 µl	
ITS1F/ITS4R	10 µM/aluke	1 µl	“60”
E8F/E1115R		1 µl	
BT1AF/BT1AR		1 µl	
ITS1F/ITS4R		5 µl	
E8F/E1115R		5 µl	
BT1AF/BT1AR		5 µl	
ScerF/ScerR	5 µM/aluke	2 µl	”58”
ITS1F/ITS4R	10 µM/aluke	1 µl	
E8F/E1115R		1 µl	
ProqF/ProqR	10 µM/aluke	40 µl	”60_40sykliä”
ITS1F/ITS4R		40 µl	

#### 4.1.6 Spesifisyyden tarkistus geelielektroforeesilla

Elektroforeesipuskurina käytettiin 10-kertaista TBE-puskuria, joka valmistettiin seuraavan ohjeen mukaan: 54 g TRISiä (tris(hydroksimetyyli)aminometaani,  $C_4H_{11}NO_3$ ), 27,5 g boorihappoa ja 37,5 g EDTA (etyleenidiamiinitetraetikkahappo,  $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ) sekoitettiin 1 l lasipullossa PCR-laatuiseen veden kanssa. Puskuria käytettiin suhteessa 1:10 laimennettuna agaroosigeelin valmistuksessa ja elektroforeesilaitteessa.

Elektroforeesigeelinä käytettiin 2 % agaroosigeeliä, joka valmistettiin seuraavan ohjeen mukaan: 7 g agaroosigeelijauhetta, 350 ml 1xTBE-puskuria ja 35 µl Invitrogen SYBR Safe DNA-väriä (Fisher Scientific Oy, Vantaa).

Elektroforeesilaitteeseen lisättiin noin 2,2 l 1-kertaista TBE-puskuria (kunnes agarosigeelilevy peittyi kokonaan). Geelilevyn reunimmaisiin kuopakkeisiin pipetoitiin 4 µl kokostandardia DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp) (Roche Diagnostics Oy, Espoo) ja 0,7 µl latauspuskuria DNA Gel Loading Dye (6X) (Fisher Scientific Oy, Vantaa). Latauspuskuria sekoitettiin 1,7 µl PCR-reaktioihin ja seosta pipetoitiin 1 l µl geelin kuopakkeisiin. Geelielektroforeesi ajettiin seuraavasti: 120 V ja 330 mA 45 minuutin ajan.

## 4.2 Säilörehu ja käsittelyt

Tutkimusaineisto käsitti näytteet säilöntäkokeesta, jossa selvitettiin säilöntäaineiden vaikutusta valkolupiini-kevätkuonaseoksen säilönnässä. Koetta varten kylvettiin seoksena valkolupiinia (*Lupinus albus*, Feodora-lajike) ja kevätkuonaa (*Triticum aestivum*, Amaretto-lajike) Helsingin yliopiston Viikin opetus- ja tutkimustilalla (60° N, 25° E) 19. päivä toukokuuta vuonna 2014. Peltö oli lannoitettu edellisenä syksynä karjanlannalla ja keväällä typpilannoitteella. Rehut korjattiin kahdessa kuiva-ainepitoisuudessa. Esikuivaamaton rehu niitettiin ja säilöttiin 19. päivä elokuuta noin 150 g/kg kuiva-ainepitoisuudessa. Esikuivatettu rehu niitettiin 16. päivä elokuuta, esikuivatettiin 40 tuntia noin 240 g/kg kuiva-ainepitoisuuteen ja säilöttiin 19. päivä elokuuta. Seosrehu niitettiin lautasniitokoneella (Krone EasyCut 3210 CV, Maschinenfabrik Bernard Krone GmbH, Spelle, Saksa) 10 cm sänkeen. Niiton ja kuivatuksen jälkeen rehut silputtiin laboratoriosilppurilla (Wintersteigner, Ried im Innkreis, Itävalta) 1–4 cm pituiseksi silpuksi.

Rehu käsiteltiin muurahaishapolla (MH) tai natriumnitriitti-heksamiiniseoksella (NAHE) kolmella eri annostustasolla. Lisäksi tehtiin kontrollikäsittely (CON) ilman säilöntäainetta (taulukko 5). Muurahaishappoa (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) lisättiin 100 %:na liuoksena ilmaistuna 2 (MH2), 4 (MH4) tai 6 (MH6) litraa per tonni tuoretta rehua. Natriumnitriittia (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) lisättiin kaikkiin NAHE-käsittelyihin 900 grammaa per tonni tuoretta rehua. Heksamiinia (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) lisättiin 0, 300 tai 600 g per tonni tuoretta rehua. Kaikki säilöntäaineet levitettiin rehuun vesiliuoksena 10 millilitraa per kg tuoretta rehua. Kontrolli käsiteltiin hanavedellä, jota levitettiin myös 10 millilitraa per kg tuoretta rehua. Vesiliuokset suihkutettiin suihkepullolla käsiteltävään rehuun, jonka jälkeen rehu sekoitettiin huolellisesti. Molemmilla kuiva-ainetasoilla tehtiin kolme replikaattia per käsittely ja rehu säilöttiin 42:een 1,5 litran



lasisiiloon (Weck, Werder-Olfingen, Saksa). Siilot varastoitiin huoneenlämmössä (20–22 °C) 154 päivää.

#### 4.3 Näytteiden otto ja kemiallinen analyysi

Siilojen täytön yhteydessä otettiin molemmilla kuiva-ainetasoilla rehumassasta yksi edustava raaka-ainenäyte. Näytteiden kuiva-ainepitoisuus määritettiin kuivaamalla tuoreet näytteet uunissa (Memmert, Memmert GmbH, Schwabach, Saksa) 105 °C:ssa 24 h. Tuoreet näytteet pakastettiin (-20 °C), jotta myöhemmin voitiin analysoida puskurikapasiteetti, tuhka, kokonais- ja liukoinen typpi, vesiliukoiset hiilihydraatit, nitraatti, klostridit ja *S. cerevisiae*.

Siilojen avauksen jälkeen sisältö sekoitettiin ja näytteitä otettiin heti tehtäviin kuiva-ainepitoisuuden, pH:n ja aerobisen stabiiliuden analyysihin. Säilönnällisen laadun näytteet ja mikrobinäytteet pakastettiin (-20 °C). Käymisparametrit (maitohappo, vesiliukoiset hiilihydraatit, haihtuvat rasvahapot, alkoholit, asetonit ja etyyliesterit) analysoitiin Humboldt Universität zu Berlinissä. Typpi, ammoniakkityppi, pH, aerobinen stabiilius ja kaikki ennen säilöntää otetut näytteet analysoitiin Helsingin yliopistolla. Kaikki analyysimenetelmät on kuvattu julkaisussa König ym. (2017).

#### 4.4 Klostridien ja hiivan analyysi qPCR:llä

Klostrideista analysoitiin rehunäytteistä qPCR:llä neljä lajia *C. butyricum*, *C. turobutyricum*, *C. sporogenes* ja *C. perfringens*. Analyysit tehtiin Luonnonvarakeskuksen DNA-laboratoriossa Vantaalla. Jokaisesta siilosta punnittiin noin 3 grammaa rehunäytettä sentrifuugiputkeen. Putkeen lisättiin 10 ml maito-glukoosi-maitohappopuskuria ja seos homogenisoitiin ULTRA-TURRAXilla (Janke und Kunkel GmbH und Co KG IKA-Werk, Staufen, Saksa). Homogeeniset seokset sentrifuugattiin 10 000xg 15 minuuttia huoneenlämmössä. Sentrifuugiputkista kaadettiin nestefaasi pois ja putken pohjalle kerynyt pelletti sekoitettiin. Pelletistä punnittiin noin 200 mg DNA-eristystä varten. DNA-eristys suoritettiin Macherey-Nagel NucleoSpin Soil -kitillä (Macherey-Nagel GmbH und Co KG, Düren, Saksa). Eristyskitillä saadaan eristettyä DNA:ta niin elävistä soluista kuin itiöistäkin. Kitin DNA-eristysohjeita seurattiin käyttäen SL1-lyysispuskuria ilman SX-voimistajaa.

Taulukko 5. Koesiilojen numerot, käsittely, kuiva-ainetaso ja säilörehujen kuiva-ainepitoisuus (g/kg).

Siilo	Käsittely	Kuiva-ainetaso	Kuiva-ainepitoisuus
1	CON	1	215
2	CON	1	214
3	CON	1	205
4	MH2	1	206
5	MH2	1	214
6	MH2	1	212
7	MH4	1	227
8	MH4	1	220
9	MH4	1	208
10	MH6	1	242
11	MH6	1	218
12	MH6	1	227
13	NAHE0	1	225
14	NAHE0	1	238
15	NAHE0	1	225
16	NAHE300	1	228
17	NAHE300	1	222
18	NAHE300	1	227
19	NAHE600	1	219
20	NAHE600	1	205
21	NAHE600	1	212
22	CON	2	138
23	CON	2	131
24	CON	2	128
25	MH2	2	133
26	MH2	2	129
27	MH2	2	133
28	MH4	2	138
29	MH4	2	138
30	MH4	2	146
31	MH6	2	127
32	MH6	2	137
33	MH6	2	134
34	NAHE0	2	152
35	NAHE0	2	148
36	NAHE0	2	143
37	NAHE300	2	135
38	NAHE300	2	142
39	NAHE300	2	169
40	NAHE600	2	134
41	NAHE600	2	135
42	NAHE600	2	128

CON – kontrolli, MH - muurahaishappo (2,4 tai 6 l/t tuoretta rehua), NAHE - natriumnitriitti (900 g/t tuoretta rehua) + heksamiini (0, 300 tai 600 g/t tuoretta rehua)

Eristetty DNA eluoiitiin 40 µl SE-puskuria. DNA-eristuksen onnistuminen tarkistettiin tavallisella PCR:llä (MJ Research PTC-100) ja yleisellä 16S rRNA-geenin -alukkeella. PCR-ohjelma sisälsi 10 minuutin alkudenaturaatio 94 °C:ssa ja sen jälkeen 40 sykliä seuraavasti: 15 s 95 °C:ssa, 30 s 50 °C:ssa ja 30 s 72 °C:ssa.

Rehunäytteistä analysoitiin qPCR:llä yksi hiivalaji *S. cerevisiae*. Analyysi tehtiin kotieläintieteiden laboratoriossa Helsingin yliopistossa. Jokaisesta siilosta punnittiin noin 30 grammaa rehunäytettä ja näytteeseen lisättiin 200 ml tislattua vettä homogenisointia varten. Näytteet homogenisoitiin tehosekoittimella. Tästä eteenpäin DNA-eristys seurasi klostridi-DNA:n eristyskaavaa. Eristetty hiiva-DNA eluoiitiin 30 µl SE-puskuria.

Taulukkoon 6 on koottu analysoitujen klostridien alukesekvenssit, PCR-tuotteiden koko ja qPCR-standardien teossa käytetyn bakteerikannan numero. Standardien teossa käytettiin DSMZ-kantakokoelmaa (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Saksa). Alukesekvenssit on suunniteltu lajispesifisiksi 16S rRNA geenialukkeiksi (König ym. 2017) ja ne olivat valmiina Luonnonvarakeskuksen DNA-laboratoriossa. *S. cerevisiae* alukesekvenssit ovat 5.8S ja ITS2 alueilta, joista F-alue oli yleisempi ja R-alue lajispesifinen (taulukko 2).

Taulukko 6. Klostridien alukesekvenssit, PCR-tuotteen koko (König ym. 2017) ja kantanumerot.

Laji	Alukesekvenssi	PCR-tuotteen koko (nukleotidia)	Kantanumero
<i>Clostridium butyricum</i>	F5'-GTAATGGAGGAAGCCACTTCGGT-3' R5'-CGAGGTTGCATCTCATTGTACCGA-3'	254	DSM 10702
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	F5'-ACATCCCCTGAATAACCTAGAGATAGGC-3' R5'-GCGGTATTGCTTCTCTTTGTTCTGC-3'	272	DSM 2637
<i>Clostridium sporogenes</i>	F5'-ATCCCTTGCATAGCCTAGAGATAGGT-3' R5'-AGTTTTGCTCCACCTCACGGTC-3'	285	DSM 795
<i>Clostridium perfringens</i>	F5'-CCCTTGCATTACTCTTAATCGAGGAAAT-3' R5'-CGGTATTGCATCTCTGTACCAG-3'	268	DSM 756

Reaktiutilavuus klostrideille oli 20 µl. Reaktio koostui 1 µl:sta DNA-näytettä ja 19 µl:sta reaktioliuosta (Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, Thermo Scientific, Waltham,

MA, USA). Reaktioliuoksessa oli kumpaakin F- ja R-aluketta 0,375 µmol. Kvantitatiiviset PCR-ajot tehtiin Rotor-Gene 6000 -laitteella (Corbett Research, Australia). *C. butyricumilla*, *C. tyrobutyricumilla* ja *C. sporogenesillä* PCR-ohjelma sisälsi 10 minuutin alkudenaturaation 95 °C:ssa ja sen jälkeen 40 sykliä seuraavasti: 30 s 95 °C:ssa, 30 s 55 °C:ssa ja 30 s 72 °C:ssa. *C. perfringensin* ohjelma oli muuten sama kuin muiden klostridien paitsi, että 55 °C:een sijaan lämpötila laski 52 °C:seen. Fluoresenssin mittaustempötila oli *C. butyricumilla* muista lajeista poiketen 80 °C, jotta mittausta häiritsevät alukkeiden keskinäiset monistumistuotteet denaturoituisivat. Absoluuttinen kvantifikaatio saavutettiin lisäämällä standardikäyrät. Jokaiselle tutkitulle klostridilajille luotiin oma standardikäyrä. Standardikäyrät valmistettiin laimentamalla klostridien alukeliuoksia (taulukko 6)  $10^8$  kopiota/µl:sta  $10^2$  kopiota/µl:aan asti.

Reaktiot *S. cerevisiae*lle olivat tilavuudeltaan 10 µl ja ne pipetoitiin optisille 384-kaivolevyille (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Saksa). Reaktiot koostuivat 2,5 µl:sta DNA-näytettä ja 7,5 µl:sta reaktioliuosta (SYBR Green Master Mix, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Saksa). Reaktioliuos sisälsi kumpaakin F- ja R-aluketta 5 µM/aluke. *S. cerevisiae*n qPCR-ajot tehtiin LightCycler 480 -laitteella (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Saksa). PCR-ohjelma sisälsi 5 minuutin alkudenaturaation 95 °C:ssa ja sen jälkeen 45 sykliä seuraavasti: 10 s 95 °C:ssa, 20 s 55 °C:ssa ja 30 s 72 °C:ssa. Absoluuttinen DNA:n pitoisuusmääritys tehtiin standardisuoran avulla. Standardisuoran standardit valmistettiin 1:5 laimennossarjan pitoisuuksilla 50, 10, 2, 0,4, 0,08 ja 0,016 ng/µl. *S. cerevisiae*n alukeseosta otettiin 20 µl ja sekoitettiin 80 µl TRIS-liuosta (5mM TRIS, pH 8,5). Edellistä vahvempaa standardia otettiin aina 20 µl, joka sekoitettiin aina 80 µl TRIS-liuosta, jotta saatiin kaikki 5 standardilaimennosliuosta.

#### 4.5 Laskut ja tilastolliset käsittelyt

Klostridipitoisuuksien määrittystä varten säilörehunäytteet ajettiin rinnakkaisnäytteinä qPCR:llä. Ajoista saatiin rinnakkaisnäytteille kopiokopio/µl ja näistä arvoista laskettiin keskiarvot kopiokopio/µl jokaiselle näytteelle. Keskiarvot kerrottiin määrällä SE-puskuria, johon eristetty DNA eluoiitiin (klostridit 40 µl) ja tämä arvo jaettiin näytepelletin painolla, joka punnittiin DNA-eristystä varten (200 mg). Näin saatiin tulokseksi kopioita/gramma näytettä.

Hiivapitoisuuksien määrittystä varten säilörehunäytteet ajettiin qPCR:llä neljänä rinnakkaisnäytteenä per siilo. PCR:n tehokkuus laskettiin LinRegPCR-ohjelman (versio 2017.1.0.0, lataus: <http://LinRegPCR.HFRC.nl>) avulla, kuten on kuvattu Ruijterin ym. (2009) tutkimuksessa. Excel-taulukkolaskentaohjelmaan tallennettu qPCR-ajon raakadata avattiin LinRegPCR-ohjelmalla. Ohjelma laski ajon taustafluoresenssin ja PCR:n tehokkuuden ja näiden tulokset tallennettiin taas Excel-taulukkolaskentaohjelmaan. Tämän jälkeen Excel-taulukkolaskentaohjelmassa laskettiin LinRegPCR:n tuloksia apuna käyttäen mikrobien PCR-replikaattien keskiarvo per siilo.

Tunnistusraja qPCR:lle oli noin 2000 geenikopiota per gramma säilörehunäytettä. Ottaen huomioon klostridien geenikopioiden vaihtelun määrän tämä vastaa noin 200 bakteerisolua tai itiötä per gramma tuoretta rehua.

Excel-taulukkolaskentaohjelmalla tehtiin regressiokuviot. Kuvioiden avulla tarkasteltiin voihapon ja klostridien sekä vastaavasti hiivojen ja etanolin välistä yhteyttä säilörehunäytteiden molemmilla kuiva-ainetasoilla.

## 5. Tulokset

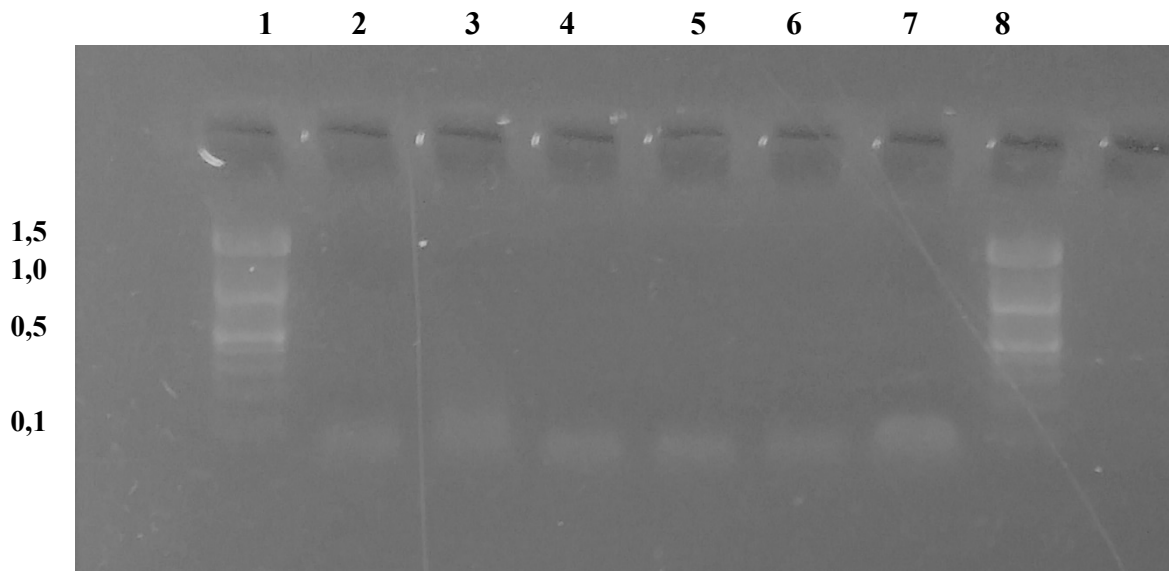
### 5.1 Hiivojen ja homeiden testaus laboratoriossa

Liitteisiin 1 ja 2 on koottu artikkeleista yleisimmin löytyneet home- ja hiivalajit. Taulukoista ilmenee, kuinka useassa artikkelissa kukin laji on mainittu nurmisäilörehun yhteydessä. Liitteeseen 3 on koottu menetelmäartikkeleista kerätty alukesekvenssit. Taulukosta ilmenevät alukesekvenssien lisäksi monistumistuotteen pituus, värjäysaine, reaktion tilavuus, käytetty laitteisto, PCR-ajon olosuhteet ja syklien määrät sekä viitteet jokaiselle taulukoidulle mikrobille.

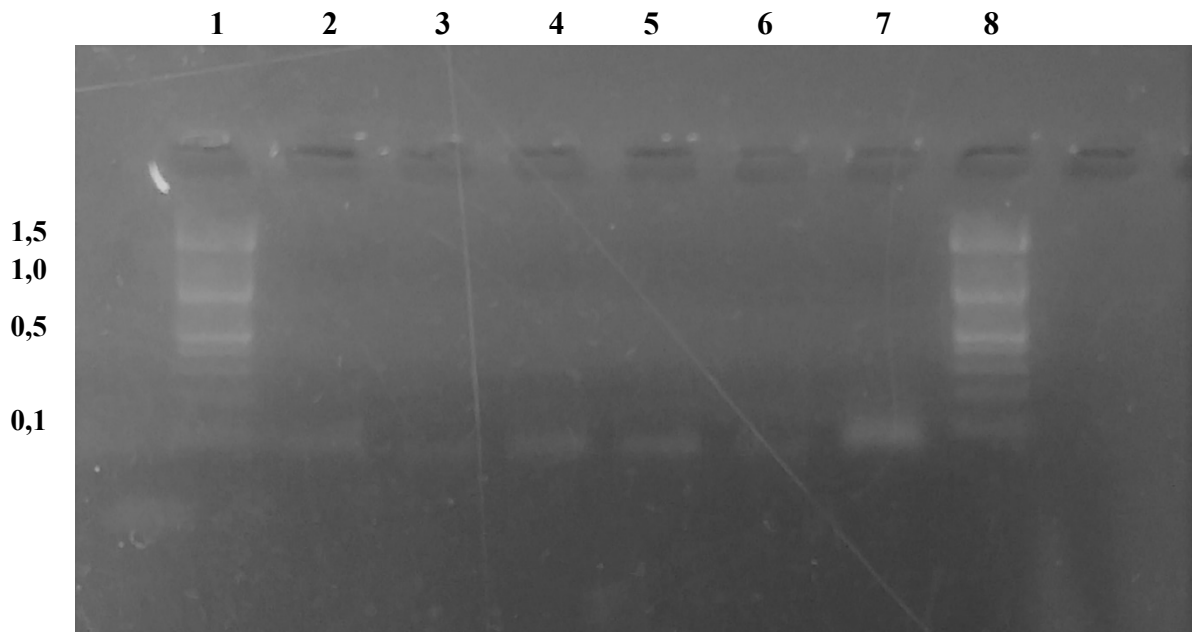
BLAST:lla testatuista alukkeista useimmat eivät olleet täysin lajispesifisiä. Linjauksessa CLUSTAL:lla alukesekvenssiä vertailtiin lähdesekvenssiin ja tuloksesta selvisi alukkeiden tarkka sijainti kromosomissa. Sekä hiiva- ja homelajeja että aiempia qPCR-tutkimuksia löytyi kirjallisuudesta runsaasti. Näistä valikoitui seitsemän lupaavinta alukeparia testattaviksi laboratoriossa testinäytteillä. DNA-konsentraatiomittauksessa testinäytteiden (pilaantunut rehu, paali, hiiva, homejuusto) DNA:n pitoisuus (mittaustulokset 4,4–430,9

ng/μl, keskiarvo 71,7 ng/μl) ja laatu (1,47–1,98 260nm/280nm-suhde, keskiarvo 1,72) olivat riittävän hyvät alukkeiden testausta varten (taulukko 3).

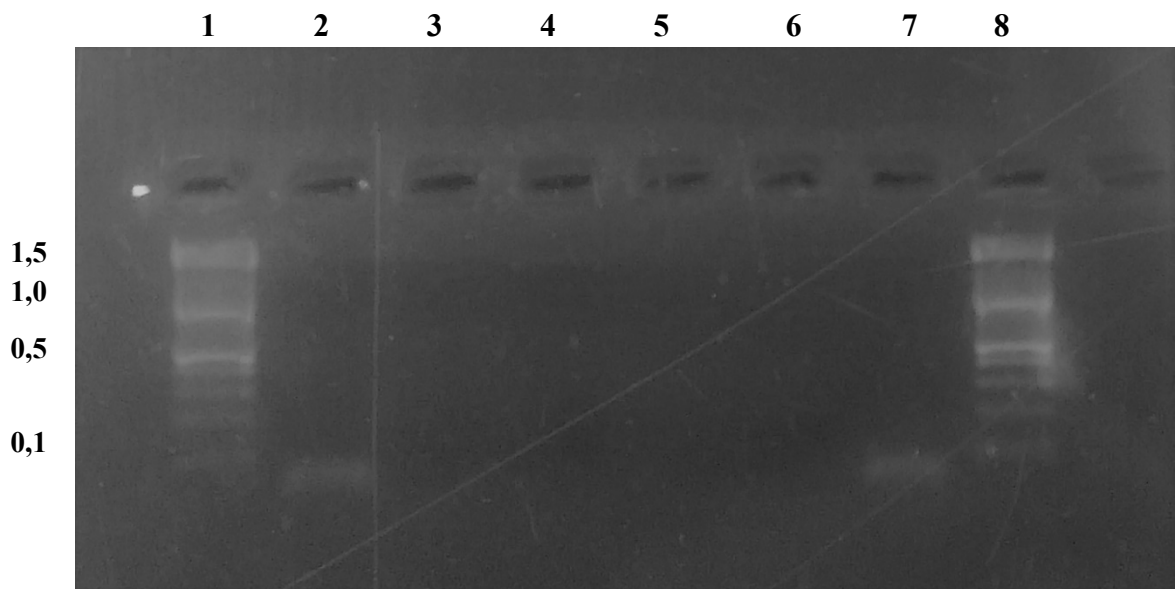
Kuvissa 2–9 on esitetty geelielektroforeesiajosten tuloksia testialukkeiden PCR-ajoista. Alukkeiden kiinnittymislämpötilassa 55 °C monistui sekä ProqF/ProqR- että CalbF/CalbR-alukkeilla näiden keskinäisiä monistumistuotteita, jotka näkyvät diffuusina viivana geelillä alle 100 nukleotidin kohdalla (taulukko 4 sekä kuva 2 ja 3). Alukkeelle GcanF/GcanR monistui alukkeiden keskinäistä monistumista kaivoihin 2 ja 7. Tämä monistuminen näkyy kahtena diffuusina viivana geelillä alle 100 nukleotidin kohdalla (kuva 4). Testinäytteinä käytettiin näille alukepareille paalirehua. Geelielektroforeesin perusteella tuotetta ei monistunut. Näytteet eivät joko sisältäneet *P. roqueforti* -hometta, *C. albicans* tai *G. candidum* -hiivoja tai alukeparit eivät toimineet PCR:llä testatuissa oloissa.



Kuva 2. Geelielektroforeesiajon tulos ProqF/ProqR-alukkeille. Kaivossa 1 ja 8 kokostandardi, kaivo 2: paali1.1, kaivo 3: paali2.1, kaivo 4: paali 3.1, kaivo 5: paali5.1, kaivo 6: paali8.1 ja kaivo 7: nollanäyte (tuotteen odotuspituus 106 nukleotidia, kokostandardin pituudet vasemmassa reunassa ovat tuhansina nukleotideina 0,1–1,5 eli 100–1500 nukleotidia).



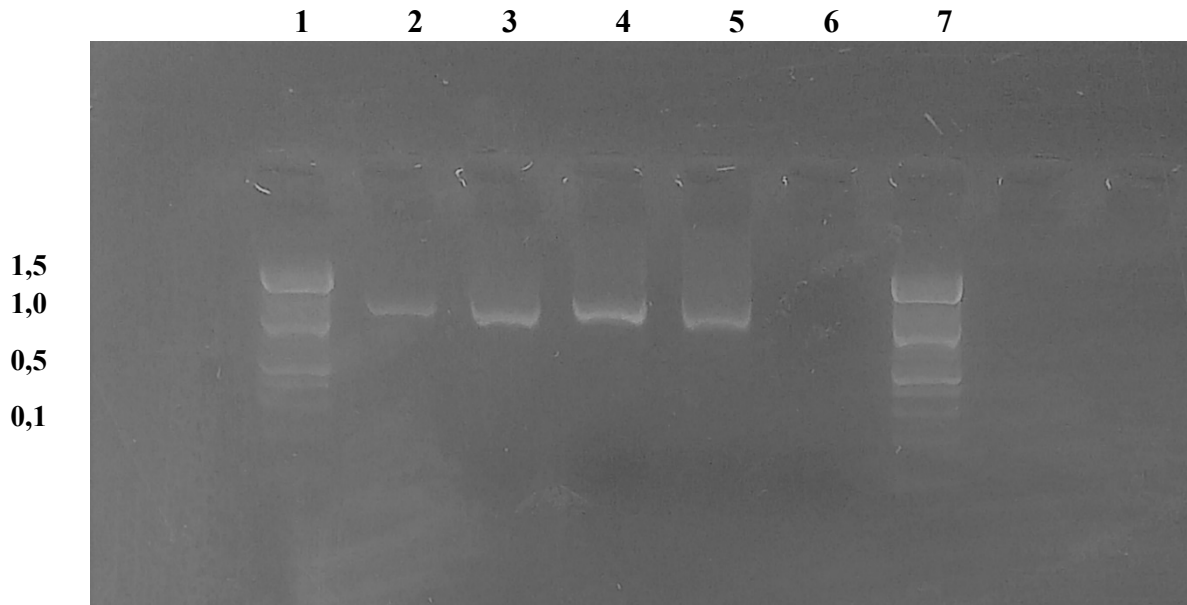
Kuva 3. Geelielektroforeesiajon tulos CalbF/CalbR-alukkeille. Kaivossa 1 ja 8 kokostandardi, kaivo 2: paali1.1, kaivo 3: paali2.1, kaivo 4: paali 3.1, kaivo 5: paali5.1, kaivo 6: paali8.1 ja kaivo 7: nollanäyte (kokostandardin pituudet vasemmassa reunassa ovat tuhansina nukleotideina 0,1–1,5 eli 100–1500 nukleotidia).



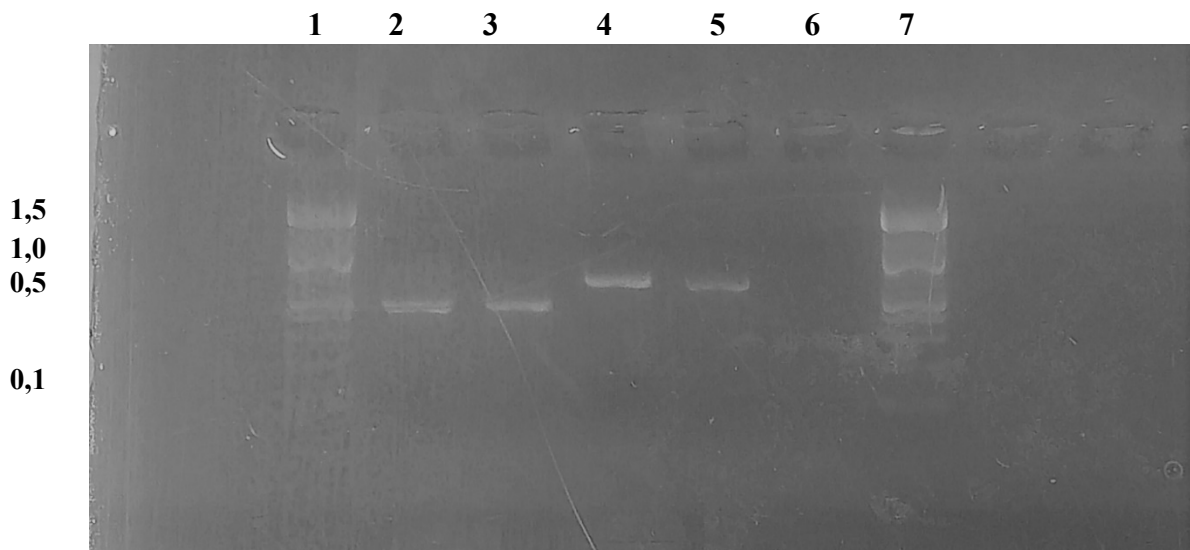
Kuva 4. Geelielektroforeesiajon tulos GcanF/GcanR-alukkeille. Kaivossa 1 ja 8 kokostandardi, kaivo 2: paali1.1, kaivo 3: paali2.1, kaivo 4: paali 3.1, kaivo 5: paali5.1, kaivo 6: paali8.1 ja kaivo 7: nollanäyte (kokostandardin pituudet vasemmassa reunassa ovat tuhansina nukleotideina 0,1–1,5 eli 100–1500 nukleotidia).

Kuvat 5 ja 6 ovat geelielektroforeesitulokset ajolle, jonka alukkeiden kiinnittymislämpötila oli 60 °C (taulukko 4). Alukkeilla E8F/E1115R ja ITS1F/ITS4R monistui tuotetta PCR-ajossa ja tuotteet olivat kokostandardiin verrattuna odotetun pituiset (kuvat 5 ja 6). Testinäytteinä käytettiin paalirehua ja homeista rehunäytettä kahdella eli DNA-määrällä

(1 µl ja 5 µl). ITS1F/ITS4R-alukepari on yleinen sieni- ja E8F/E1115R-alukepari yleinen bakteeri-indikaattori. Geelielektroforeesin perusteella käytetyt testinäytteet sisälsivät sekä sieni- että bakteeri-DNA:ta. Nämä alukeparit näyttivät toimivan hyvin PCR:llä testatuissa oloissa.



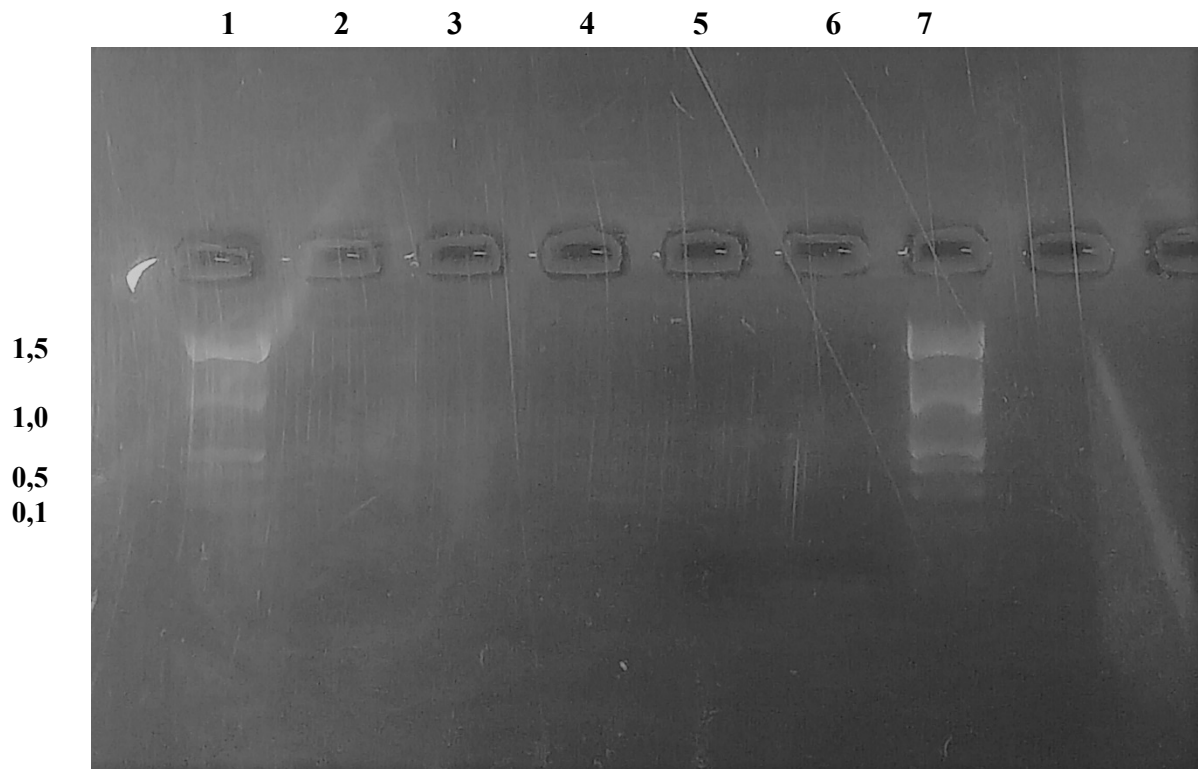
Kuva 5. Geelielektroforeesiajon tulos E8F/E1115R-alukkeille. Kaivossa 1 ja 7 kokostandardi, kaivo 2: paali12(1), kaivo 3: paali12(5), kaivo 4: homerehu13(1), kaivo 5: homerehu13(5) ja kaivo 6: nollanäyte (tuotteen odotuspituus 1000 nukleotidia, kokostandardin pituudet vasemmassa reunassa ovat tuhansina nukleotideina 0,1–1,5 eli 100–1500 nukleotidia).



Kuva 6. Geelielektroforeesiajon tulos ITS1F/ITS4R-alukkeille. Kaivossa 1 ja 7 kokostandardi, kaivo 2: paali12(1), kaivo 3: paali12(5), kaivo 4: homerehu13(1), kaivo 5: homerehu13(5) ja kaivo 6: nollanäyte (tuotteen odotuspituus 550-600 nukleotidia, kokostandardin pituudet vasemmassa reunassa ovat tuhansina nukleotideina 0,1–1,5 eli 100–1500 nukleotidia).

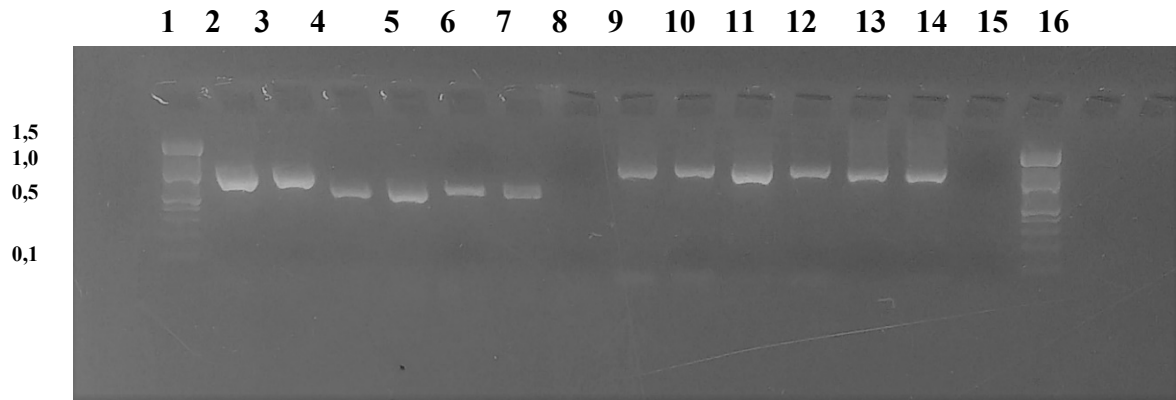


Kuva 7 on myös geielektroforeesitulos ajolle, jonka alukkeiden kiinnittymislämpötila oli 60 °C (taulukko 4). Alukeparilla BT1AF/BT1AR ei monistunut PCR-ajossa lainkaan tuotetta. Alukepari on yleinen homeindikaattori. Geielektroforeesin perusteella käytetyt testinäytteet eivät joko sisältäneet lainkaan home-DNA:ta tai alukkeet eivät toimineet PCR:llä testatuissa oloissa.



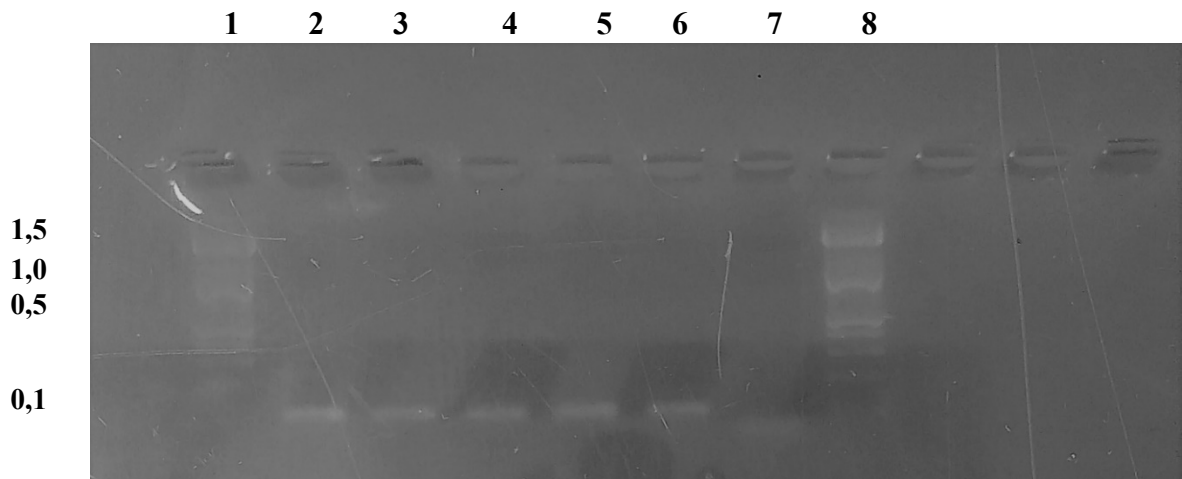
Kuva 7. Geielektroforeesiajon tulos BT1AF/BT1AR-alukkeille. Kaivossa 1 ja 7 kokostandardi, kaivo 2: paali12(1), kaivo 3: paali12(5), kaivo 4: homerehu13(1), kaivo 5: homerehu13(5) ja kaivo 6: nollanäyte (tuotteen odotuspituus 550 nukleotidia, kokostandardin pituudet vasemmalla reunassa ovat tuhansina nukleotideina 0,1–1,5 eli 100–1500 nukleotidia).

Kuva 8 on geielektroforeesitulos ajolle, jonka alukkeiden kiinnittymislämpötila oli 58 °C (taulukko 4). Testinäytteinä käytettiin hiiva-, juusto- ja homerehunäytteitä. ITS1F/ITS4R-alukkeiden monistamat tuotteet näkyvät kuvan vasemmalla puolella ja kuvan oikealla puolella näkyvät E8F/E1115R-alukkeilla monistuneet tuotteet. Monistuneet tuotteet näyttivät kokostandardiin verrattuna odotetun pituisilta. E8F/E1115R-alukkeilla on ilmeisesti myös tapahtunut alukkeiden keskinäistä monistumista, joka näkyy himmeänä diffuusina viivana geelillä alle 100 nukleotidin kohdalla. Nämä näytteet näyttivät elektroforeesitulosten perusteella sisältävän sekä sieni- että bakteeri-DNA:ta. Alukkeet toimivat PCR:llä myös näissä testatuissa oloissa.



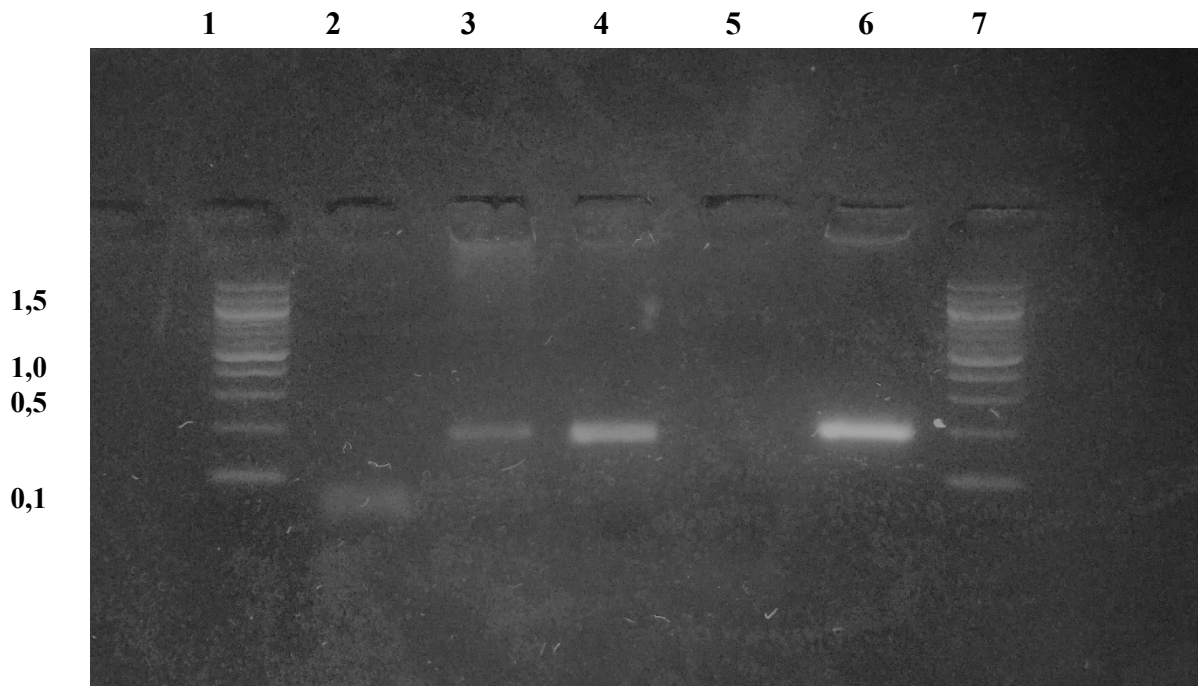
Kuva 8. ITS1F/ITS4R ja E8F/E1115R -alukkeiden elektroforeesitulos hiiva- ja homejuustonäytteille. Kaivoissa 1 ja 16 kokostandardi, kaivo 2: hiiva1, kaivo 3: hiiva2, kaivo 4: juusto1, kaivo 5: juusto2, kaivo 6: homerehu14.1, kaivo 7: homerehu14.2, kaivo 8: nollanäyte, kaivo 9: hiiva1, kaivo 10: hiiva2, kaivo 11: juusto1, kaivo 12: juusto2, kaivo 13: homerehu14.1, kaivo 14: homerehu14.2 ja kaivo 15: nollanäyte (tuotteiden odotuspituudet ITS1F/ITS4R 550-600 nukleotidia ja E8F/E1115R 1000 nukleotidia, kokostandardin pituudet vasemmassa reunassa ovat tuhansina nukleotideina 0,1–1,5 eli 100–1500 nukleotidia).

ProqF/ProqR-alukeparia testattiin myös eri vahvuisilla homejuustonäytteillä alukkeiden kiinnittymislämpötilassa 60 °C (taulukko 4). Alukkeilla monistui alukkeiden keskinäisiä monistumistuotteita, jotka näkyivät diffuusina viivana geelillä alle 100 nukleotidin kohdalla (kuva 9). Geelielektroforeesin perusteella alukepari ei toiminut PCR:llä testatuissa oloissa.



Kuva 9. ProqF/ProqR-alukkeiden elektroforeesitulos homejuustonäytteille. Kaivossa 1 ja 8 kokostandardi, kaivo 2: juusto3, kaivo 3: juusto3 1:10, kaivo 4: juusto3 1:100, kaivo 5: juusto3 1:1000, kaivo 6: juusto3 1:10000 ja kaivo 7: nollanäyte (tuotteen odotuspituus 106 nukleotidia, kokostandardin pituudet vasemmassa reunassa ovat tuhansina nukleotideina 0,1–1,5 eli 100–1500 nukleotidia).

Kuva 10 on geielektroforeesitulos ajolle, jonka alukkeiden kiinnittymislämpötilana oli 60 °C (taulukko 4) alukkeelle ScerF/ScerR. Testinäytteinä käytettiin hiiva-, paali- ja homerehunäytteitä. Monistuneet tuotteet näyttivät kokostandardiin verrattuna odotetun pituisilta. Nollanäytteellä on ilmeisesti myös tapahtunut alukkeiden keskinäistä monistumista, joka näkyy himmeänä diffuusina viivana geelillä alle 100 nukleotidin kohdalla. Nämä näytteet näyttivät elektroforeesitulosten perusteella sisältävän *S. cerevisiae* -hiivaa. Alukepari toimi PCR:llä hyvin testatuissa oloissa.

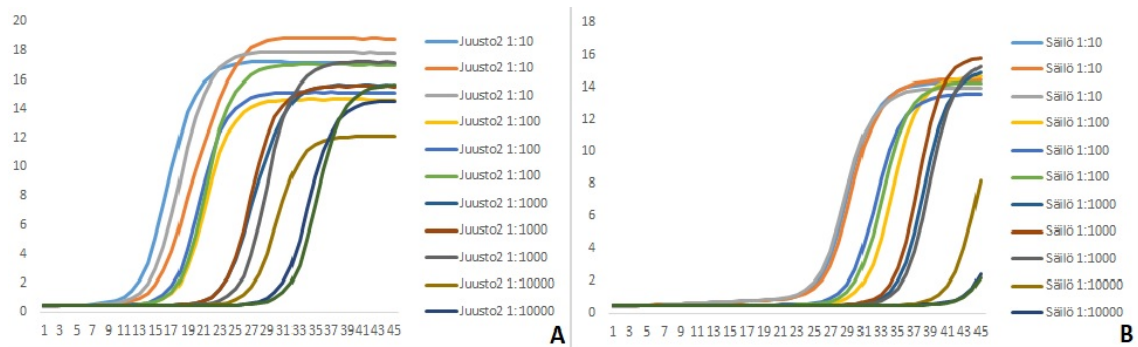


Kuva 10. ScerF/ScerR-alukkeiden elektroforeesitulos. Kaivossa 1 ja 7 kokostandardi, kaivo 2: nollanäyte, kaivo 3: homerehu14.1, kaivo 4: paali12, kaivo 5: paali5.1 ja kaivo 6: hiiva2 (tuotteen odotuspituus 175 nukleotidia, kokostandardin pituudet vasemmassa reunassa ovat tuhansina nukleotideina 0,1–1,5 eli 100–1500 nukleotidia).

Ottaen huomioon kuinka hyvin elektroforeesissa näkyvät PCR-ajoissa monistuneiden tuotteiden pituudet kuvissa 5, 6 ja 8 näyttäisivät ITS1F/ITS4R- ja E8F/E1115R-alukeparit sopivilta kvantitoitaviksi agarosigeelillä. Niistä voitaisiin densitometrisesti mitata juovien intensiteetti geelikuvista.

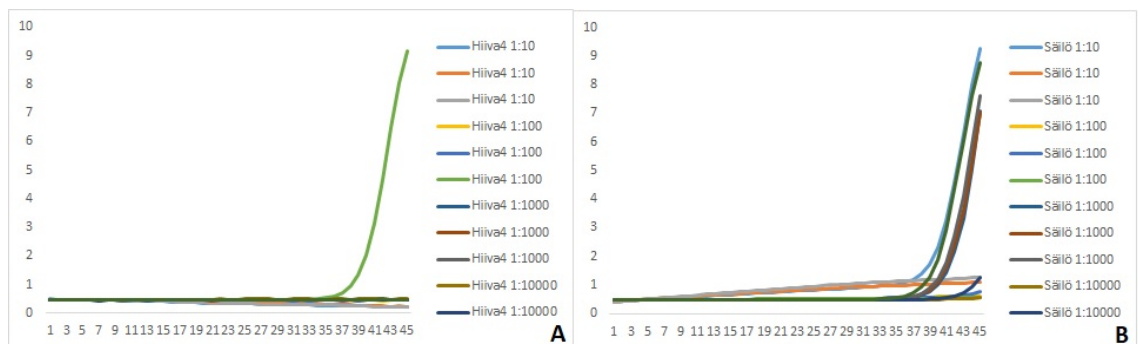
Kuvissa 11–16 on esitetty qPCR-ajon monistumiskäyrien kuvaajat alukeittain, alukekonsentraatioittain ja testinäytteittäin. Käyrät perustuvat qPCR-ajon aikana jokaisella syklillä mitattuihin fluoresenssiarvoihin. X-akselilla näkyvät syklinumerot ja y-akselilla fluoresenssin voimakkuus. ProqF/ProqR-alukkeella monistuminen alukekonsentraatiolla 2 µM/aluke (kuva 7) tapahtuu juusto2-näytteillä suunnilleen syklien 7 ja 31 välillä.

Homerehu15.1-näytteet monistuvat syklien 9 ja 41 välillä. Hiivanäytteillä monistumista tapahtui vasta syklin 35 jälkeen.



Kuva 11. ProqF/ProqR-alukkeiden amplifikaatiokäyrät alukelaimennoksen vahvuudella 2  $\mu$ M/aluke. Kuvassa A näkyy juusto2-näytteiden monistuminen eri laimennoksilla ja kuvassa B näkyy homerehu15.1-näytteiden monistuminen eri laimennoksilla.

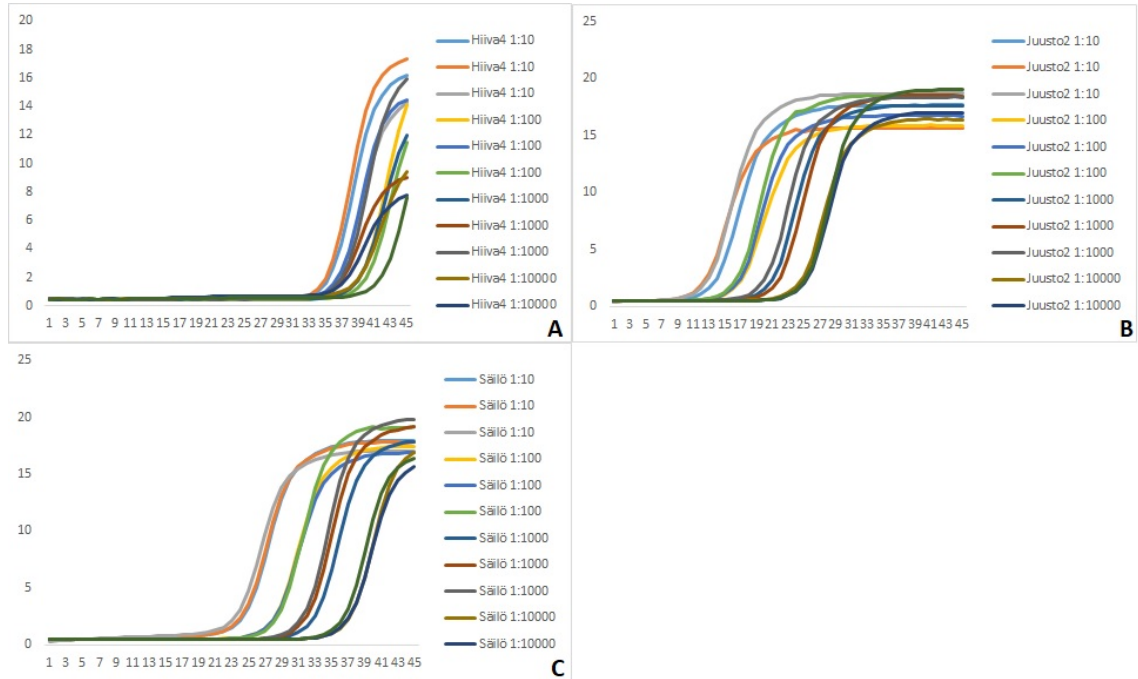
CalbF/CalbR-alukkeilla monistuminen alukekonsentraatiolla 2  $\mu$ M/aluke (kuva 8) tapahtui harvakseltaan ja sekä hiiva4- että homerehu15.1-näytteillä vasta syklin 35 jälkeen. Kuvassa B näkyi homerehu15.1-näytteillä mitattuna myös hieman taustafluoresenssia. Juusto2-näytteillä monistumista ei tapahtunut lainkaan ja ainoastaan taustafluoresenssia mitattiin qPCR:llä.



Kuva 12. CalbF/CalbR-alukkeiden amplifikaatiokäyrä alukelaimennoksen vahvuudella 2  $\mu$ M/aluke. Kuvassa A näkyy hiiva4-näytteiden monistuminen eri laimennoksilla ja kuvassa B näkyy homerehu15.1-näytteiden monistuminen eri laimennoksilla.

GcanF/GcanR-alukkeilla monistuminen alukekonsentraatiolla 2  $\mu$ M/aluke oli virheellistä. Tyypillistä monistumista ei ole tapahtunut ja fluoresenssilukemat olivat alle kahden, eli kaikki qPCR:llä mitattu fluoresenssi oli taustafluoresenssia. Monistuminen ITS1F/ITS4R-alukkeiden alukekonsentraatiolla 2  $\mu$ M/aluke oli myös virheellistä. Kaikilla testinäytteillä qPCR:llä mitattu fluoresenssi oli taustafluoresenssia.

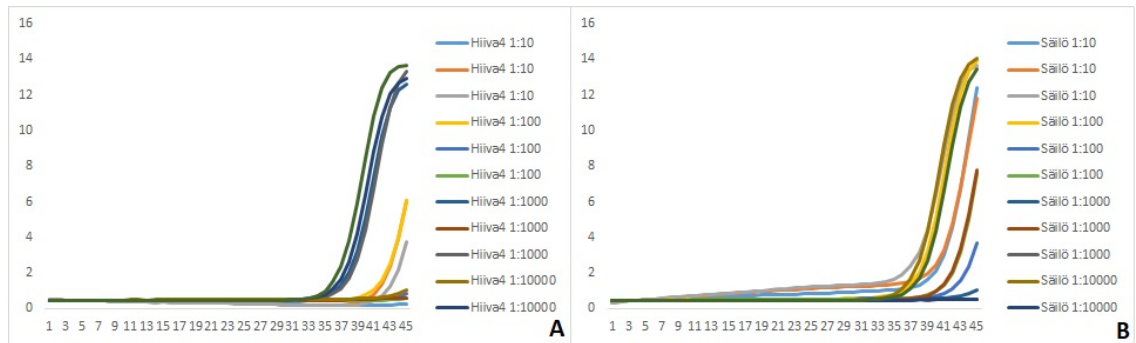
ProqF/ProqR-alukkeella monistuminen alukekonsentraatiolla 5  $\mu\text{M}$ /aluke (kuva 9) tapahtuu hiiva4-näytteillä melko myöhäisessä vaiheessa syklin 33 jälkeen. Juusto2-näytteet monistuvat sykliden 7 ja 25 välillä ja homerehu15.1-näytteet monistuvat sykliden 7 ja 36 välillä.



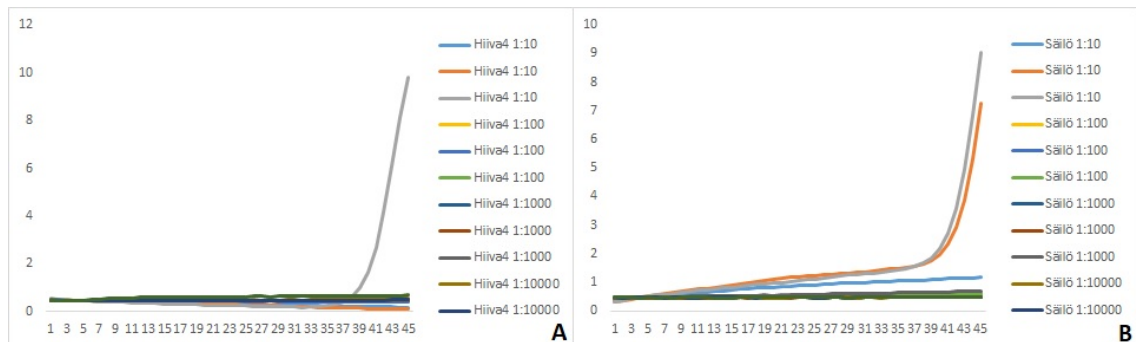
Kuva 13. ProqF/ProqR-alukkeiden amplifikaatiokäyrät alukelaimennoksen vahvuudella 5  $\mu\text{M}$ /aluke. Kuvassa A näkyy hiiva4-näytteiden monistuminen eri laimennoksilla, kuvassa B näkyy juusto2-näytteiden monistuminen eri laimennoksilla ja kuvassa C näkyy homerehu15.1-näytteiden monistuminen eri laimennoksilla.

Kuten laimeammalla alukekonsentraatiolla, alkoi CalbF/CalbR-alukkeilla monistuminen alukekonsentraatiolla 5  $\mu\text{M}$ /aluke myöhäisessä vaiheessa ajoa (kuva 10). Kaikilla näytteillä monistuminen alkoi vasta syklin 35 jälkeen. Säilörehunäytteillä mitattiin qPCR:llä myös taustafluoresenssia, joka lähti monistumaan kunnolla syklin 35 jälkeen.

GcanF/GcanR-alukkeilla monistuminen alukekonsentraatiolla 5  $\mu\text{M}$ /aluke (kuva 11) näytti paremmalta kuin monistuminen alhaisemmalla alukekonsentraatiolla. Näytteet monistuivat kuitenkin harvakseltaan ja monistuminen tapahtui vasta myöhäisillä sykleillä. Tällä alukekonsentraatiolla qPCR mittasi myös jonkin verran taustafluoresenssia.



Kuva 14. CalbF/CalbR-alukkeiden amplifikaatiokäyrä alukelaimennoksen vahvuudella 5  $\mu\text{M}$ /aluke. Kuvassa A näkyy hiiva4-näytteiden monistuminen eri laimennoksilla ja kuvassa B näkyy homerehu15.1-näytteiden monistuminen eri laimennoksilla.

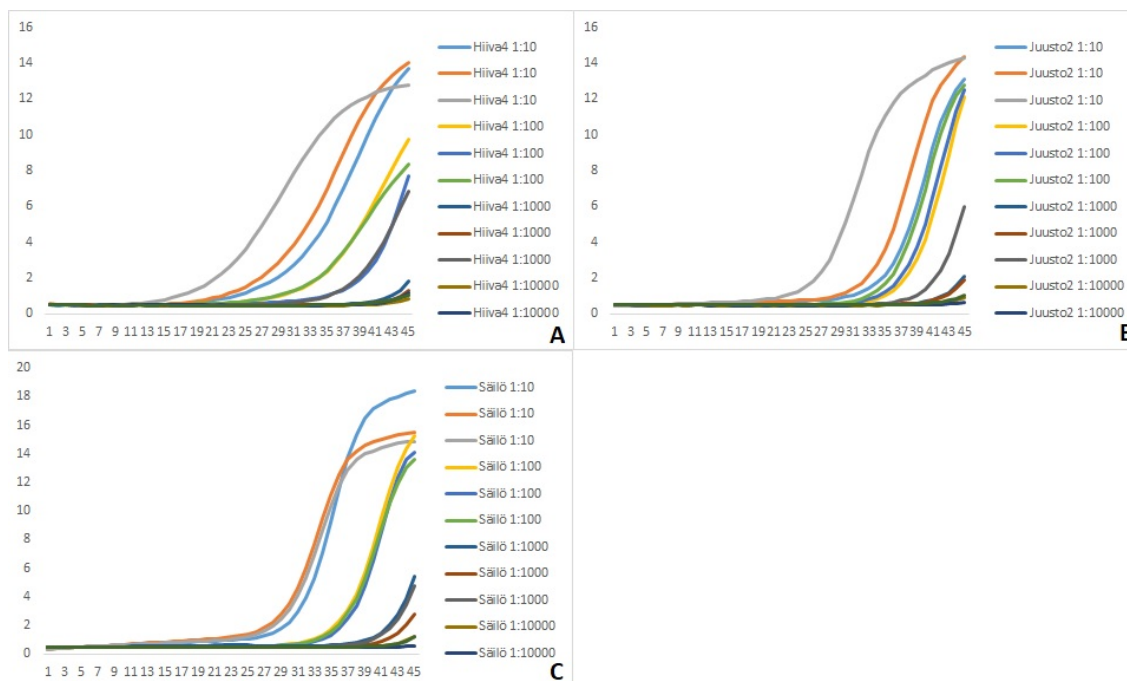


Kuva 15. GcanF/GcanR-alukkeiden amplifikaatiokäyrä alukelaimennoksen vahvuudella 5  $\mu\text{M}$ /aluke. Kuvassa A näkyy hiiva4-näytteiden monistuminen eri laimennoksilla ja kuvassa B näkyy homerehu15.1-näytteiden monistuminen eri laimennoksilla.

Monistuminen ITS1F/ITS4R-alukkeilla alukekonsentraatiolla 5  $\mu\text{M}$ /aluke (kuva 12) alkoi hiiva4-näytteillä syklillä 9 ja jatkuu qPCR-ajon loppuun asti. Monistumiskäyrät näyttivät näillä näytteillä hieman epätyypillisiltä ja olivat liian loivia. Juusto2-näytteillä monistuminen alkoi hieman myöhemmin syklillä 21, mutta jatkui myös ajon loppuun asti. Homerehu15.1-näytteillä monistuminen sijoittui syklien 9 ja 43 välille.

## 5.2 Klostridien ja hiivan määrittäminen qPCR:llä säilöntäkokeen näytteistä

Säilöntäkokeen raaka-aineiden tuhkapitoisuuksissa ei ollut eroja (taulukko 7). Taulukosta käyvät myös ilmi muun muassa puskurikapasiteetti ja nitraattipitoisuus. Puskurikapasiteetti on palkokasveille tyypillisen korkea. Molemmista raaka-ainenäytteistä löytyi klostrideja. *C. tyrobutyricumia* ja *C. butyricumia* raaka-aine I:sta ja *C. perfringensia* ja *C. butyricumia* raaka-aine II:sta. Molemmista raaka-aineista löytyi myös hiivoja, mutta esikuivatetussa raaka-aine II:ssa oli hiivamäärä korkeampi.



Kuva 16. ITS1F/ITS4R-alukkeiden amplifikaatiokäyrä alukelaimennoksen vahvuudella 5  $\mu$ M/aluke. Kuvassa A näkyy hiiva4-näytteiden monistuminen eri laimennoksilla, kuvassa B näkyy juusto2-näytteiden monistuminen eri laimennoksilla ja kuvassa C näkyy homerehu15.1-näytteiden monistuminen eri laimennoksilla.

Taulukko 7. Esikuivatun ja tuoreena tehdyn säilörehun raaka-aineen koostumus (g/kg kuiva-ainetta, jos muuta ei mainittu) ja mikrobipitoisuudet.

	Raaka-aine I	Raaka-aine II
	Esikuivattu	Ei esikuivattu
Kuiva-aine, g/kg	240	150
Tuhka	70,4	73,9
Raakavalkuainen	151	171
Liukoinen N, g/kg N	699	487
Neutraalidetergenttikuitu	499	437
Vesiliukoiset hiilihydraatit	111	115
Vesiliukoiset hiilihydraatit, g/kg tuore rehu	26,6	17,2
Puskurikapasiteetti, mEkv/kg kuiva-ainetta	630	703
Nitraatti	3,80	3,80
Mikrobit, log kopioita/g tuoretta rehua		
<i>C. perfringens</i>	0,00	5,30
<i>C. tyrobutyricum</i>	9,61	0,00
<i>C. butyricum</i>	2,60	2,30
<i>C. sporogenes</i>	0,00	0,00
Klostridit yhteensä	9,61	5,30
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	6,81	7,43



Säilöntäkokeen käymislaadun yksityiskohtaiset tiedot säilörehuille CON, MH4 sekä NAHE-rehuille on esitetty julkaisussa König ym. (2019). Taulukkoon 8 on koottu klostridien qPCR-ajon tulokset siilokohtaisesti jokaiselle lajille ilmoitettuna kopiolumuna per gramma rehunäytettä ja siilokohtaiset voihappopitoisuudet g/kg ka. Lisäksi taulukkoon on koottu myös 16S-alukkeella tehty DNA-eristykseen onnistumisen testauksen tuloksena näytteiden kokonaismikrobimäärät kopiolumuna per gramma rehunäytettä.

Korkeammalla kuiva-ainetasolla *C. tyrobutyricumia* löytyi yhdestä rinnakkaisnäytteestä, joka säilöttiin muurahaishapolla 2 l/t tuoretta rehua. *C. tyrobutyricumia* ja *C. sporogenesisia* löytyi myös kahdesta rinnakkaisnäytteestä, jotka oli säilötty muurahaishapolla 4 l/t tuoretta rehua. *C. tyrobutyricumia* ja *C. sporogenesisia* löytyi lisäksi tällä kuiva-ainetasolla vielä yhdestä rinnakkaisnäytteestä, joka oli säilötty muurahaishapolla 6 l/t tuoretta rehua. Pienemmällä kuiva-ainetasolla löytyi *C. perfringensia* yhdestä rinnakkaisnäytteestä, joka oli säilötty muurahaishapolla 4 l/t tuoretta rehua.

Suuremmalla kuiva-ainetasolla löytyi voihappoa yhdestä kontrollirinnakkaisnäytteestä, yhdestä rinnakkaisnäytteestä 2 l muurahaishappoa/t tuoretta rehua, kaikista kolmesta rinnakkaisnäytteestä 4 l muurahaishappoa/t tuoretta rehua, yhdestä rinnakkaisnäytteestä 6 l muurahaishappoa/t tuoretta rehua, kaikista NAHE0-rinnakkaisnäytteistä ja yhdestä NAHE600-rinnakkaisnäytteestä.

Pienemmällä kuiva-ainetasolla voihappoa löytyi yhdestä kontrollirinnakkaisnäytteestä ja kahdesta rinnakkaisnäytteestä 6 l muurahaishappoa/t tuoretta rehua. Siiloissa, joista löytyi klostrideja, oli voihappoa vain suuremman kuiva-ainepitoisuuden näytteissä. Kahdessa rinnakkaisnäytteessä, jotka säilöttiin muurahaishapolla 4 l/t tuoretta rehua ja yhdessä rinnakkaisnäytteessä, joka säilöttiin muurahaishapolla 6 l/t tuoretta rehua. Molemmilla kuiva-ainetasoilla löytyi yhdestä rinnakkaisnäytteestä klostrideja, mutta ei voihappoa. Lopuissa voihappopitoisissa rinnakkaisnäytteissä ei taas löytynyt klostrideja. Voihappopitoisuudet ylittävät 1 g/kg ka neljässä näytteessä, mutta lopuissa pitoisuudet jäävät alle 1 g/kg ka. Taulukossa 9 on havainnollistettu klostridipitoisten siilojen jakautuminen säilöntäaineittain.



Taulukko 8. Klostridien qPCR-ajon tulokset kopioita per gramma rehunäytettä (siilot 1–21 esikuivattu ja siilot 22–42 ei esikuivattu), voi happopitoisuudet g/kg ka ja mikrobi-DNA kopioina per gramma rehunäytettä.

Siilo	Käsittely	<i>C. perfringens</i> kopiot/g	<i>C. tyrobutyricum</i> kopiot/g	<i>C. sporogenes</i> kopiot/g	<i>C. butyricum</i> kopiot/g	Voihappo g/kg ka	16S kopiot/g
1	CON	0,00	0,00	0,00	0,00	0,45	$5,56 \cdot 10^{12}$
2	CON	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$5,19 \cdot 10^{12}$
3	CON	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$5,46 \cdot 10^{12}$
4	MH2	0,00	99,00	0,00	0,00	0,00	$1,78 \cdot 10^{13}$
5	MH2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$1,33 \cdot 10^{13}$
6	MH2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	$1,32 \cdot 10^{13}$
7	MH4	0,00	0,00	$46,13 \cdot 10^3$	0,00	1,00	$5,86 \cdot 10^{13}$
8	MH4	0,00	$744,22 \cdot 10^3$	0,00	0,00	2,90	$3,36 \cdot 10^{13}$
9	MH4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,85	$3,29 \cdot 10^{13}$
10	MH6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$9,13 \cdot 10^{11}$
11	MH6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$9,83 \cdot 10^{11}$
12	MH6	0,00	$3,02 \cdot 10^3$	$3,12 \cdot 10^3$	0,00	9,54	$2,19 \cdot 10^{13}$
13	NAHE0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,52	$4,74 \cdot 10^{12}$
14	NAHE0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,28	$4,27 \cdot 10^{12}$
15	NAHE0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23	$3,59 \cdot 10^{12}$
16	NAHE300	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$2,27 \cdot 10^{12}$
17	NAHE300	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$3,85 \cdot 10^{12}$
18	NAHE300	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$3,83 \cdot 10^{12}$
19	NAHE600	0,00	0,00	0,00	0,00	1,32	$4,36 \cdot 10^{12}$
20	NAHE600	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$6,35 \cdot 10^{12}$
21	NAHE600	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$3,46 \cdot 10^{12}$
22	CON	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$1,17 \cdot 10^{13}$
23	CON	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	$1,08 \cdot 10^{12}$
24	CON	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$2,27 \cdot 10^{12}$
25	MH2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$1,23 \cdot 10^{13}$
26	MH2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$3,62 \cdot 10^{12}$
27	MH2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$2,61 \cdot 10^{13}$
28	MH4	$148,52 \cdot 10^3$	0,00	0,00	0,00	0,00	$1,18 \cdot 10^{12}$
29	MH4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$5,79 \cdot 10^{12}$
30	MH4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$2,16 \cdot 10^{12}$
31	MH6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	$4,81 \cdot 10^{13}$
32	MH6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,62	$8,35 \cdot 10^{11}$
33	MH6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$8,51 \cdot 10^{11}$
34	NAHE0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$4,10 \cdot 10^{12}$
35	NAHE0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$1,52 \cdot 10^{12}$
36	NAHE0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$1,09 \cdot 10^{12}$
37	NAHE300	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$3,07 \cdot 10^{12}$
38	NAHE300	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$1,52 \cdot 10^{12}$
39	NAHE300	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$1,85 \cdot 10^{12}$
40	NAHE600	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$4,62 \cdot 10^{12}$
41	NAHE600	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$5,02 \cdot 10^{12}$
42	NAHE600	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$3,37 \cdot 10^{12}$
RA I	-	0,00	$4,087 \cdot 10^9$	0,00	400,00	-	$1,81 \cdot 10^{15}$
RA II	-	$200,00 \cdot 10^3$	0,00	0,00	200,00	-	$3,58 \cdot 10^{15}$

CON – kontrolli, MH - muurahaishappo (2,4 tai 6 l/t tuoretta rehua), NAHE - natriumnitriitti (900 g/t tuoretta rehua) + heksamiini (0, 300 tai 600 g/t tuoretta rehua)

RA I – Raaka-aine I (esikuivattu), RAII – Raaka-aine II (ei esikuivattu)

Taulukossa 10 on *S. cerevisiae* qPCR-ajon tulokset siilokohtaisesti kopiokukujen keskiarvona per gramma rehunäytettä ja siilokohtaiset etanolipitoisuudet g/kg ka. Kaikista siiloista löytyi *S. cerevisiae* ja etanolia. Etanolia löytyi suurempia pitoisuuksia pienemmän kuiva-ainetason siiloista.

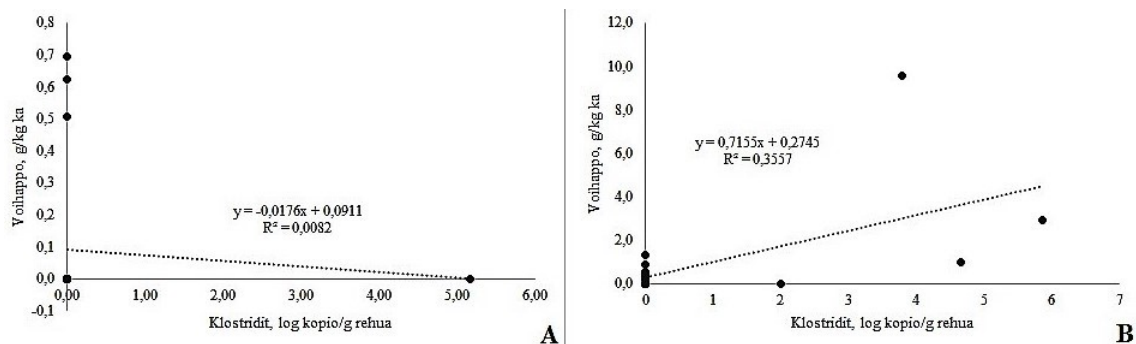
Säilörehuissa ei todettu selkeää yhteyttä klostridien kopiokukujen ja voi happopitoisuuden välillä. Molemmille kuiva-ainetasoille laskettiin omat regressiosuorat (kuva 17).

Kopiolukujen ja voihapsen välillä ei ollut yhteyttä pienemmällä kuiva-ainepitoisuudella ( $R^2=0,008$ ) ja suuremmalla kuiva-ainepitoisuudella regressioyhtälön selitysaste oli myös pieni ( $R^2=0,36$ ).

Taulukko 9. Klostridipitoiset siilot säilöntäaineittain (kopiota/g rehua).

Siilo	4	7	8	12	28
CON	-	-	-	-	-
MH2	<i>C. tyrobutyricum</i> (99 kopiota/g)		-	-	-
MH4	-	<i>C. sporogenes</i> ( $46,13 \cdot 10^3$ kopiota/g)	<i>C. tyrobutyricum</i> ( $744,22 \cdot 10^3$ kopiota/g)	-	<i>C. perfringens</i> ( $148,52 \cdot 10^3$ kopiota/g)
MH6	-	-	-	<i>C. tyrobutyricum</i> ( $3,02 \cdot 10^3$ kopiota/g) <i>C. sporogenes</i> ( $3,12 \cdot 10^3$ kopiota/g)	-
NAHE0	-	-	-	-	-
NAHE300	-	-	-	-	-
NAHE600	-	-	-	-	-

CON – kontrolli, MH - muurahaishappo (2,4 tai 6 l/t tuoretta rehua), NAHE - natriumnitriitti (900 g/t tuoretta rehua) + heksamiini (0, 300 tai 600 g/t tuoretta rehua)



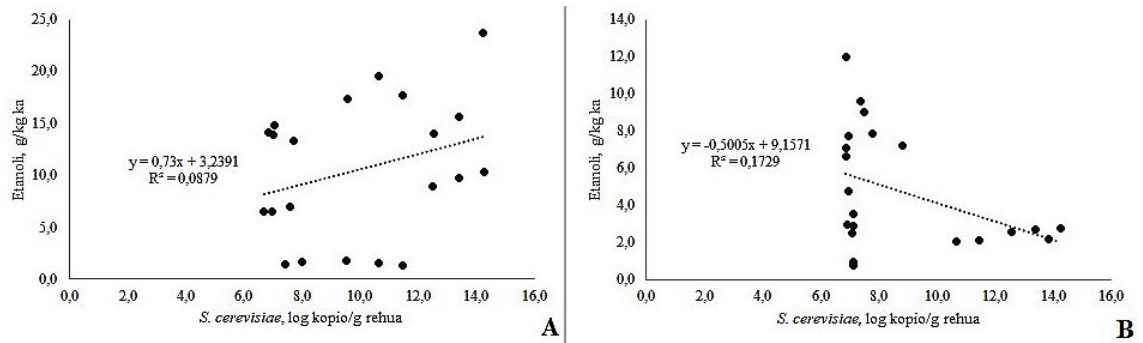
Kuva 17. Säilörehun siilo-kohtainen voihsisipitoisuuden ja klostridien määrän välinen yhteys säilörehun raaka-aineen kuiva-ainepitoisuuden olleessa 150 g/kg ka (A) tai 240 g/kg ka (B).

Säilörehuissa ei todettu riippuvuutta myöskään *S. cerevisiaen* kopiolukujen ja etanolipitoisuuden välillä. Molemmille kuiva-ainetasoille laskettiin omat regressiosuorat (kuva 18). Kopiolukujen ja etanolin välisten regressiosuorien selitysasteet pienemmällä kuiva-ainepitoisuudella ( $R^2=0,09$ ) ja suuremmalla kuiva-ainepitoisuudella ( $R^2=0,17$ ) olivat hyvin pienet.

Taulukko 10. *S. cerevisiae* qPCR-ajojen tulokset kopioiden keskiarvo per gramma rehunäytettä (siilot 1–21 esikuivattu ja siilot 22–42 ei esikuivattu).

Siilo	Käsittely	<i>S. cerevisiae</i> kopioiden keskiarvo/g	Etanoli, g/kg ka
1	CON	$7,34 \cdot 10^6$	6,60
2	CON	$7,66 \cdot 10^6$	7,10
3	CON	$59,78 \cdot 10^6$	7,83
4	MH2	$668,99 \cdot 10^6$	7,24
5	MH2	$31,05 \cdot 10^6$	8,99
6	MH2	$8,77 \cdot 10^6$	4,78
7	MH4	$8,84 \cdot 10^6$	7,74
8	MH4	$7,69 \cdot 10^6$	12,02
9	MH4	$15,59 \cdot 10^6$	9,61
10	MH6	$13,27 \cdot 10^6$	0,93
11	MH6	$26,47 \cdot 10^6$	0,75
12	MH6	$5,37 \cdot 10^6$	2,49
13	NAHE0	$1,78 \cdot 10^{14}$	2,77
14	NAHE0	$2,5 \cdot 10^{13}$	2,69
15	NAHE0	$3,87 \cdot 10^{12}$	2,59
16	NAHE300	$2,88 \cdot 10^{11}$	2,14
17	NAHE300	$45,88 \cdot 10^9$	2,04
18	NAHE300	$3,26 \cdot 10^9$	2,19
19	NAHE600	$8,28 \cdot 10^6$	2,93
20	NAHE600	$13,45 \cdot 10^6$	3,54
21	NAHE600	$13,27 \cdot 10^6$	2,91
22	CON	$10,43 \cdot 10^6$	13,90
23	CON	$7,22 \cdot 10^6$	14,12
24	CON	$11,73 \cdot 10^6$	14,82
25	MH2	$1,78 \cdot 10^{14}$	23,71
26	MH2	$2,52 \cdot 10^{13}$	15,64
27	MH2	$3,66 \cdot 10^{12}$	13,94
28	MH4	$3,00 \cdot 10^{11}$	1,28
29	MH4	$4,38 \cdot 10^9$	1,55
30	MH4	$3,26 \cdot 10^9$	1,77
31	MH6	$51,52 \cdot 10^6$	13,31
32	MH6	$27,77 \cdot 10^6$	1,41
33	MH6	$99,13 \cdot 10^6$	1,67
34	NAHE0	$39,18 \cdot 10^6$	6,99
35	NAHE0	$4,86 \cdot 10^6$	6,53
36	NAHE0	$9,22 \cdot 10^6$	6,53
37	NAHE300	$1,84 \cdot 10^{14}$	10,35
38	NAHE300	$2,68 \cdot 10^{13}$	9,75
39	NAHE300	$3,13 \cdot 10^{12}$	8,87
40	NAHE600	$3,00 \cdot 10^{11}$	17,64
41	NAHE600	$44,40 \cdot 10^9$	19,51
42	NAHE600	$3,58 \cdot 10^9$	17,35

CON – kontrolli, MH - muurahaishappo (2,4 tai 6 l/t tuoretta rehua), NAHE - natriumnitriitti (900 g/t tuoretta rehua) + heksamiini (0, 300 tai 600 g/t tuoretta rehua)



Kuva 18. Säilörehun siilokohtainen etanolipitoisuuden ja hiivojen määrän välinen yhteys säilörehun raaka-aineen kuiva-ainepitoisuuden olleessa 150 g/kg ka (A) tai 240 g/kg ka (B).

## 6. Tulosten tarkastelu

### 6.1 Hiivojen ja homeiden testaus laboratoriossa

Kirjallisuuskatsauksen yhteydessä löytyi määrällisesti vähän artikkeleita, jotka käsittelivät säilörehussa esiintyviä hiivoja ja homeita. Homeita käsitteleviä julkaisuja löytyi enemmän kuin hiivoja. Osa näistä homeista, kuten esimerkiksi *P. roqueforti*, oli mainittu useammassa tutkimuksessa kuin esimerkiksi *Schizophyllum commune*. Lukuisampi maininta voisi selittyä lajin laajemmalla esiintyvyydellä tai voi liittyä kasvatus- ja/tai laboratorio-olosuhteisiin. Hiivoja käsitteleviä julkaisuja löytyi kaksi kappaletta. Vanhemmassa julkaisussa hiivat oli mainittu suku-tasolla (*Pichia*, *Geotrichum* ja *Candida*) ja uudemmassa julkaisussa hiivat oli mainittu tarkemmin laji-tasolla (*Pichia fermentas*, *P. anomala*, *Geotrichum candidum*, *Candida boidinii* ja *C. lambica*).

SL1- puskuri SX-voimistajan kanssa oli elektroforeesin perusteella paras yhdistelmä yleisille sieni- ja bakteerialukepareille ITS1F/ITS4R ja E8F/E1115R eristettäessä DNA:ta testinäytteistä. BT1AF/BT1AR-alukepari osoittautui heti alussa toimimattomaksi, joten se jätettiin pois testauksesta. ITS1F/ITS4R- ja E8F/E1115R-yleisalukkeet toimivat geelielektroforeesin perusteella hyvin testinäytteillä ja testatuissa PCR-olosuhteissa. Spesifinen homealukepari ProqF/ProqR ei toiminut tavallisella PCR:llä ja geelielektroforeesilla testattaessa, mutta toimi qPCR-laitteella. Spesifiset hiiva-alukeparit CalbF/CalbR ja GcanF/GcanR eivät näyttäneet toimivan testatuissa PCR-olosuhteissa tai testatuilla näytteillä. Spesifinen hiiva-alukepari ScerF/ScerR sen sijaan toimi PCR-olosuhteissa ja sen tulokset näyttivät johdonmukaisilta geelillä. ITS1F/ITS4R- ja E8F/E1115R-alukkeiden PCR-tulokset näyttivät uskottavilta geelillä.

ProqF/ProqR-alukkeilla tulokset olivat ristiriitaisia. Alukepari ei toiminut tavallisella PCR:llä ja geelielektroforeesilla testattaessa, mutta qPCR:llä alukepari toimi. Kuvien 2 ja 9 perusteella ProqF/ProqR-alukeparin monistustuote on epäspesifinen, koska se on lyhyempi kuin odotettu monistustuotteen pituus 106 nukleotidia. Sen sijaan qPCR-ajot (kuvat 11 ja 13), toimivat hyvin molemmilla alukelaimennoksilla (2  $\mu$ M/aluke ja 5  $\mu$ M/aluke). Erityisesti testinäytteissä, joissa oli *P. roquefortia* sisältävästä juustosta eristettyä DNA:ta (kuva 13B), monistuminen tapahtui pienillä syklien lukumäärillä (9–23), mikä kertoo korkeasta *P. roquefortin* DNA-määrästä näytteessä. Selkeä monistuminen saatiin myös säilörehun homepesäkkeistä eristetystä DNA:sta (kuva 13C). Monistuminen tapahtui syklien lukumäärillä 20–35, jonka perusteella kyseisessä säilörehussa oli *P. roqueforti* -homeetta. Todennäköisesti ProqF/ProqR-alukeparin erilaiseen toimivuuteen tavallisessa PCR:ssä ja qPCR:ssä vaikuttivat eri reaktiitolavuudet ja erilaiset näyte-DNA:n alukkeiden konsentraatioiden suhteet tavallisessa PCR:ssä ja qPCR:ssä.

Spesifisellä homealukkeella ProqF/ProqR monistumista tapahtui (2  $\mu$ M/aluke konsentraatiolla) juusto2- ja homerehu15.1-näytteissä, mutta ei hiivanäytteissä. Tulokset olivat odotusten mukaiset. Vahvemmallalla 5  $\mu$ M/aluke konsentraatiolla monistumista tapahtui kaikilla näytteillä. Hiiva4-näytteillä monistuminen tapahtui tosin niin myöhäisillä sykleillä, että kyseessä on todennäköisesti epäspesifistä monistumista, kuten pitäisikin olla. Kuvaajissa, joissa qPCR-ajojen monistuminen alkoi vasta myöhäisillä sykleillä eli syklillä 35 tai sen jälkeen (esimerkiksi alukkeilla CalbF/CalbR molemmilla alukekonsentraatioilla) ei voida olla varmoja, onko kyseessä alukkeiden keskinäistä monistumista vai oikeasti tuotteen monistuminen. Monistuminen on todennäköisesti epäspesifistä. Tämän perusteella alhaisempi alukekonsentraatio (2  $\mu$ M/aluke) on optimaalisempi *P. roquefortin* määrittämiseen qPCR:llä säilörehunäytteistä. ProqF/ProqR-alukepari näytti toimivan qPCR-olosuhteissa paremmin kuin tavallisella PCR:llä. Alukepari oli suunniteltu SYBR Green -kemialle (liite 3), jota testeissä käytettiin myös. Mahdollisesti qPCR-olosuhteet olivat lähempänä suunniteltuja olosuhteita kuin tavallisen PCR:n olosuhteet.

Spesifisellä hiiva-alukkeella CalbF/CalbR ei monistunut kummallakaan alukekonsentraatiolla *C. albicans* -hiivaa mistään näytteistä ennen sykliä 35. Näytteet eivät joko sisältäneet kyseistä hiivalajia tai alukepari ei toiminut testatuissa olosuhteissa. Todennäköisempää on, että alukepari ei toiminut testatuissa oloissa. Syynä tähän voisi olla, että alukkeet oli alun perin suunniteltu toisenlaiselle kemialle (TaqMan; liite 3). Todennäköisesti

samasta syystä GcanF/GcanR-alukepari ei myöskään toiminut kummallakaan alukekon-sentraatiolla. Tämä alukepari oli myös alun perin suunniteltu toisenlaiselle kemialle (liite 3). Ehkä alukkeet eivät siksi toimineet qPCR:llä testatuissa olosuhteissa ja toisella kemi-alla.

Yleisellä ITS1F/ITS4R-sienialukeparilla monistuminen epäonnistui laimeammalla aluke-seoksella. Vahvemmallalla alukeseoksella monistuminen ITS1F/ITS4R-alukeparilla alkaa ihan hyvässä vaiheessa ajoa, mutta jatkuu hyvin pitkälle myöhäisiä syklejä. Nämä yleiset alukkeet oli alun perin suunniteltu perinteiselle PCR:lle (liite 3). Alukkeet eivät siis to-dennäköisesti toimineet testatuissa qPCR-olosuhteissa välttämättä parhaimmalla mahdol-lisella tavalla. Tästä johtuneen myös ITS1F/ITS4R- ja E8F/E1115R-alukkeiden hyvä toi-minta PCR-oloissa (oikean kokoinen tuote), mutta epäspesifiset tulokset qPCR:llä.

Klostridialukkeet oli todettu jo aikaisemmassa tutkimuksessa (König ym. 2017) toimi-viksi, joten ne otettiin suoraan käytettäväiksi säilöntäkokeen näytteille. Säilöntäkokeeseen valittiin myös ScerF/ScerR-alukepari, koska alukepari toimi hyvin testiajo-olosuhteissa. Tämän spesifisen hiiva-alukeparin hyvä toimivuus selittyy osaksi varmasti sillä, että alu-kepari oli suunniteltu tutkimuksessa käytetylle SYBR Green -kemialle (liite 3). Tämä alukepari ja sen tulokset vaikuttivat kaikista seitsemästä testatusta alukeparista vakuutta-vimmilta.

## 6.2 Klostridien ja hiivan määrittäminen qPCR:llä säilöntäkokeen näytteistä

Säilörehun laadun määrittäminen on kannattavaa, jos halutaan ruokkia karjaa taloudellisesti (Park ym. 2005). Yleensä säilörehun laadun arvioimiseen käytetään kemiallisia kriteerejä (Jonsson 1989). Säilöntä arvioidaan yleensä onnistuneeksi, kun rehun maitohappopitoi-suus on suuri ja pH matala. Suuret pitoisuudet etikkahappoa, voi-happoa ja ammoniakkia taas viittaavat pilaantuneeseen rehuun (Jonsson 1989). Voi-happo ja ammoniakki ovat näistä suoraan liitettävissä klostrideihin (Pahlow ym. 2003). Joskus käytetään myös ke-miallisia parametreja bakteerien itiömäärien ennustukseen (Jonsson 1989). Tämä voi ai-heuttaa ongelmia, sillä itiöpitoisuudet voivat olla suuria sekä suurien että pienten voi-hap-pitoisuuksien yhteydessä (Jonsson 1989). Vastaavasti rehu, jossa voi-happopitoisuudet jäävät alle tunnistusrajan, ei välttämättä ole klostridivapaata rehua.

Rehussa, jossa oli pienempi kuiva-ainepitoisuus (150 g/kg ka) löytyi voihappoa kontrol-lista, mutta klostrideja ei löytynyt. Sen sijaan siilot, joissa klostrideja esiintyi, oli kaikki säilötty muurahaishapolla (taulukko 8 ja 9). DNA-eristys onnistui testattiin yleisellä 16S-alukkeella. PCR-ajon tulosten perusteella eristys onnistui ja näytteet sisälsivät runsaasti mikrobi-DNA:ta (taulukko 8). Kuten etukäteen oletettiin, eroja löytyy ainakin silminnähden säilöntäaineiden välillä. Kontaminoitujen siilojen määrä oli kuitenkin niin vähäinen, että tulokset eivät riittäneet erojen tilastolliseen tarkasteluun. Näiden lisäksi klostrideja löytyi myös raaka-aineista. Voihappopitoisuus on epäsuora ja epäluotettava mittari rehun klostridikontaminaatiolle, koska voihappoa löytyi myös siiloista, joissa ei ollut klostrideja. Mahdollisesti siilosta qPCR:n avulla löytyneet klostridit olivat itiöitä tai kuolleita mikrobeja. Itiöiden tunnistus selittäisi klostridilöydöt siiloista, joissa ei havaittu voihappoa (siilot 4 ja 28). Nämä tulokset sopivat yhteen Königin ym. (2017) tulosten kanssa, joissa voihappopitoisuus ei korreloinut klostridien pitoisuuden kanssa. Pahlwin ym. (2003) mukaan voihappopitoisuudet ovat suuret, kun ne ylittävät 5 g/kg ka. Tämä raja ylittyi yhdessä rinnakkaisnäytteessä, joka oli säilötty muurahaishapolla 6 l/t tuoretta rehua. Muissa näytteissä voihappopitoisuudet jäivät alle tämän rajan.

Aikaisemmassa säilöntäkokeessa (König ym. 2017) löytyi runsaasti klostrideja rehunäyt-teistä. Tämän aiemman kokeen analytiikan perusteella oli odotettavissa alukkeiden hyvä toiminta. Lupiinit sisältävät paljon alkaloideja (Kroc ym. 2017). Nämä alkaloidit voivat mahdollisesti inhiboida joko DNA-polymeraasia tai translaatiota (McAllister ym. 2018). Kvantifiointiin käytetyt alukkeet ovat ribosomialukkeita, joten translaatiotason inhibitio vaikuttaisi niiden toimintaan. DNA:n eristyskitti sisältää kyllä inhibiittoreiden poisto -vaiheen ja lisäksi DNA laimentuu. Inhibiittoreiden ei pitäisi siis vaikuttaa. Ehkä inhibiit-toreita on ollut rehussa niin runsaasti, että niistä osa on ohittanut kolonnin eikä DNA:n laimennuskaan auttanut. Näillä tuloksilla mahdollista inhibiittoreiden vaikutusta ei voida sulkea kokonaan pois. Mahdollisesti näytteiden sisältämät PCR-inhibiittorit vaikuttivat siis qPCR-ajoihin ja siksi tuloksissa on niin vähän klostrideja. Tämä oli yllättävää, eikä tätä olisi osattu odottaa aikaisemman kokeen perusteella.

Pienet klostridipitoisuudet voidaan mahdollisesti selittää myös kasvuston niittokorkeu-della. Niitto 10 cm sängin korkeuteen on vähentänyt osaltaan maaperäkontaminaatiota ja samalla klostridien määrää rehussa. Lisäksi niitetty koerehu kerättiin manuaalisesti pel-loilta niiton ja mahdollisen kuivatuksen jälkeen. Tämä on myös voinut osaltaan vähentää

maaperäkontaminaatiota. Myöskin klostridien esiintyminen anaerobisissa taskuissa (Visers ym. 2007b) on voinut vaikuttaa klostridien alhaisiin pitoisuuksiin, jos näytteenotto ei ole osunut klostriditaskuihin. Muurahaishappo on saattanut vähentää mikrobikilpailua siiloissa klostridien kannalta suotuisaksi. Muurahaishapon on tarkoitus estää mikrobitoimintaa rehussa (Wilkinson ym. 2003). Klostridit kestävät happamuutta paremmin kuin monet muut mikrobit (Pahlow ym. 2003). Lisäksi rehuissa oli suurempi nitraattipitoisuus (nitraattia 3,8 g/kg ka vs. <0,2 g/kg ka) kuin Königin ym. (2017) kokeessa. Säilönnän alussa enterobakteerit muuttavat nitraattia nitriitiksi ja nitriitti estää klostrideja tehokkaasti (Pahlow ym. 2003). Tämä voi osittain myös selittää tutkimuksen pienet klostridimäärät.

Anaerobisissa oloissa hiivat tuottavat alkoholeja ja suuria etanolipitoisuuksia esiintyy säilörehuissa, joissa on pieni kuiva-ainepitoisuus (Weiss 2017). Tämä sopii yhteen kokeen tulosten kanssa. Etanolia löytyi vähän muurahaishapolla käsitellyistä rehuista, mikä ei vastaa Weissin (2017) toteamusta, että muurahaishappo lisää rehun etanolituotantoa. Weiss (2017) on todennut myös, että nitriitti- ja heksamiinisuoloja sisältävät säilöntäaineet vähentävät etanolipitoisuuksia rehussa ja inhiboivat hiivoja. Tämä ei vastaa pienemmällä kuiva-ainetasolla saatuja tuloksia, sillä rehun etanolipitoisuus kasvoi mitä enemmän heksamiinia säilöntäaineseokseen lisättiin. Esikuivatetussa rehussa etanolipitoisuudet eivät muuttuneet yhtä paljon. Muurahaishapon sanotaan vahvistavan hiivoja ja alkoholikäymistä, koska hiivat pärjäävät maitohappobakteereja paremmin matalassa pH:ssa ja sietävät muurahaishappoa paremmin (Pahlow ym. 2003, Weiss 2017). Vaikka muurahaishapolla säilötyissä siiloissa ei ollut juurikaan etanolia, löytyi niistä paljon hiivoja. Säilörehu, joka on käsitelty muurahaishapolla, saattaa joskus sisältää suuria määriä hiivoja ja vain vähän maito- ja etikkahappoa (Pahlow ym. 2003). Heksamiini on mahdollisesti lisännyt hiivan aktiivisuutta NAHE300-tasolla. Muckin (2010) mukaan etanolipitoisuus säilörehussa on suuri, kun se ylittää 20 g/kg ka. Tämä raja ylittyi ainoastaan yhdessä rinnakkaisnäytteessä, joka oli säilötty muurahaishapolla 2 l/t tuoretta rehua. Muissa näytteissä etanolipitoisuudet jäivät alle tämän rajan.

*S. cerevisiae*n pitoisuudet olivat molemmilla kuiva-ainetasoilla suuret, jopa käsitellyssä rehussa korkeammat kuin kontrollissa. Etanolipitoisuudet olivat pienet, vaikka hiivapitoisuudet olivat suuret. Hiivoilla oli mahdollisesti liian vähän happea käytettävissä. Hiivat ovat valinnaisesti anaerobeja, mutta tarvitsevat tiettyihin välttämättömiin anabolisiin



toimintoihin happea (Madigan ja Martinko 2009). *S. cerevisiae* on crabtree-positiivinen hiiva, mikä tarkoittaa, että sillä on matalampi affiniteetti sokerille kuin crabtree-negatiivisilla mikrobeilla (Pahlow ym. 2003). Mahdollisesti etanolia oli rehussa vähemmän, koska jokin muu sokerille korkean affiniteetin omaava mikrobi käytti sokeria.

## 7. Johtopäätökset

Haittamikrobit ovat ilmeisen yleisiä säilörehussa ja niitä on tunnistettu kirjallisuudessa lukuisia lajeja. Kirjallisuudesta löytyi hyvät lähtökohdat testata haittamikrobeille suunniteltuja alukkeita laboratorio-oloissa ja seitsemän alukeparia valikoitui testattavaksi. Alukepareista sopivimmaksi valikoitui *S. cerevisiae* -hiivan ScerF/ScerR-alukepari, joka otettiin klostridien *C. butyricumin*, *C. tyrobutyricumin*, *C. perfringensin* ja *C. sporogenesin* rinnalle spesifiseen tunnistukseen ja kvantitatiiviseen määrittelykseen säilöntäkokeen näytteistä. Hiivan ja klostridien spesifinen määrittely näytti tässä kokeessa olevan ristiriidassa kemiallisen analyysin tulosten kanssa. Hiivan ja säilörehun etanolipitoisuuden ja toisaalta klostridien ja voihappopitoisuuden välillä ei ollut yhteyttä. Aineisto oli kuitenkin pieni ja vain yhdestä kokeesta, joten nämä ristiriidat spesifisen qPCR-määrittelyn ja kemiallisen analyysin välillä vaativat vielä jatkotutkimuksia.

Liian yksityiskohtainen kvantifiointi voi tuoda ongelmia tulkintaan. Muut säilönnän kannalta potentiaalisesti tärkeät ja vaikuttavat mikrobilajit jäävät kvantitoinnin ulkopuolelle, kun liian spesifisesti tutkitaan yksittäisiä lajeja. Yksin kemiallisen analyysin perusteella ei voi kuitenkaan tehdä pitäviä johtopäätöksiä rehun mikrobipitoisuudesta. Kvantitointi qPCR:llä kuitenkin toimi ja toi tuloksia. Joten PCR-menetelmiä voisi käyttää osana säilörehun laadun arviointia yhdessä kemiallisten analyysien kanssa. Tässä sukuspesifiset tai vielä laajempia taksoneja tunnistavat alukkeet voivat olla lajispesifisiä alukkeita käytännöllisempiä. Esimerkiksi yleisalukepari, joka tunnistaisi klostridit sukuna, eikä yksittäisiä klostridilajeja.

## 8. Läheteet

- Azo, W.M., Lane, G.P.F., Davies W.P. & Cannon, N.D. 2012. Bi-cropping white lupins (*Lupinus albus* L.) with cereals for wholecrop froage in organic farming: The effect of seed rate and harvest dates on crop yield and quality. *Biological Agriculture & Horticulture* 28: 86–100.
- Bokulich, N.A. & Mills, D.A. 2012. Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations. *BMB Reports* 45: 377–389.
- Borreani, G., Chion, A.R., Colombini, S., Odoardi, M., Paoletti, R. & Tabacco, E. 2009. Fermentatitve profiles of field pea (*Pisum sativum*), faba bean (*Vicia faba*) and white lupin (*Lupinus albus*) silages as affected by wilting and inoculation. *Animal Feed Science and Technology* 151: 316–323.
- Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R. J., Holmes, B. J. & Muck, R. E. 2018. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silage. *Journal of Dairy Science* 101: 3952–3979.
- Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169–193.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. & Wittwer, C. T. 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55: 611–622.
- Breitmaier, E. & Jung, G. 1995. *Organische Chemie II. Spezielle Verbindungsklassen, Naturstoffe, Synthesen, Strukturaufklärung*. 2. painos. Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag. 589 s.
- Brown, T. A. 2008. *Gene Cloning & DNA Analysis. An Introduction*. 5. painos. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 386 s.
- Cremonesi, P., Vanoni, L., Silveti, T., Morandi, S. & Brasca, M. 2012. Identification of *Clostridium beijerinckii*, *Cl. butyricum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum* isolated from silage, raw milk and hard cheese by a multiplex PCR assay. *Journal of Dairy Research* 79: 318–323.
- Cherney, J. H. & Cherney, D. J. R. 2003. Assessing silage quality. Teoksessa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.) *Agronomy* 42. *Silage Science and Technology*. Madison, Wisconsin, USA: ASA, CSSA & SSSA. s. 141–198.

- Dhanasekaran, S., Doherty, M. T., Kenneth, J. & TB Trials Study Group. 2010. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of Immunological Methods* 354: 34–39.
- Driehuis, F. 2013. Silage and the safety and quality of dairy foods: A review. *Agricultural and Food Science* 22: 16–34.
- Dunier, L., Jin, L., Smiley, B., Qi, M., Rutherford, W., Wang, Y. & McAllister, T. 2015. Impact of adding *Saccharomyces* strains on fermentation, aerobic stability, nutritive value, and select lactobacilli populations in corn silage. *Journal of Animal Science* 93: 2322–2335.
- Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill III, F. R. & Smith, T. F. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*: 165–256.
- Gibson, U. E., Heid, C. A. & Williams, P. M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research* 6: 995–1001.
- Hafner, S.D., Bühler, M., Feilberg, A., Franco, R.B., Howard, C., Montes, F., Muck, R.E., Rotz, C.A. & Weiß, K. 2018. Volatile organic compounds and silage: sources, emission, and mitigation. Teoksessa: Gerlach, K. & Südekum, K.-H. (toim.). XVIII International Silage Conference 2018 (Proceedings of the XVIII International Silage Conference 24–26 July 2018, Bonn, Germany). Bad Breising, Germany: OundZ GmbH. s. 52–67.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986–994.
- Hellberg, A. 1967. A combination of nitrite and hexamine as an additive in the ensiling of herbage. *Grass and Forage Science* 22: 289–297.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, S. P. & Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10: 413–417.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A. & Guillamón, J.M. 2007. Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research* 7: 1340–1349.
- Huhtamäki, T. 19.3.2019. Ruokinta tuotosseurantatiloilla vuonna 2018. [https://www.proagria.fi/sites/default/files/attachment/tuotosseurantakarjojen\\_rehustus\\_vuonna\\_2018\\_huhtamaki.pdf](https://www.proagria.fi/sites/default/files/attachment/tuotosseurantakarjojen_rehustus_vuonna_2018_huhtamaki.pdf). ProAgria keskusten liitto. Tulostettu 1.4.2019.

- Huhtanen P., Jaakkola, S. & Nousiainen, J. 2013. An overview of silage research in Finland: From ensiling innovation to advances in dairy cow feeding. *Agricultural and Food Science* 22: 35–56.
- Jonsson, A. 1989. The role of yeasts and clostridia in silage deterioration – identification and ecology. Mikrobiologian väitöskirja. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Microbiology. 51 s.
- Julien, M-C., Dion, P., Lafrenière, C., Antoun, H. & Drouin, P. 2008. Sources of clostridia in raw milk on farms. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 6348– 6357.
- Klijn, N., Nieuwenhof, F. F. J., Hoolwerf, J. D., Van Der Waals, J. B. & Weerkamp, A. H. 1995. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2919–2924.
- Klocke, M., Mundt, K., Idler, C., McEnry, J., O’Kiely, P. & Barth, S. 2006. Monitoring *Lactobacillus platarum* in grass silages with the aid of 16S rDNA-based quantitative real-time PCR-assays. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 49–58.
- Kroc, M., Rybiński, W., Wilczura, P., Kamel, K., Kaczmarek, Z., Barzyk, P. & Święcicki, W. 2017. Quantitative and qualitative analysis of alkaloids composition in the seeds of a white lupin (*Lupinus albus* L.) collection. *Genetic Resources and Crop Evolution* 64: 1853–1860.
- König, W., König, E., Weiss, K., Tuomivirta, T.T., Fritze, H., Elo, K., Vanhatalo, A. & Jaakkola, S. 2019. Impact of hexamine addition to a nitrite-based additive on fermentation quality, *Clostridia* and *Saccharomyces cerevisiae* in a white lupin-wheat silage. *Journal of The Science of Food and Agriculture* 99: 1492–1500.
- König, W., Lamminen, M., Weiss, K., Tuomivirta, T.T., Sanz Muñoz, S., Fritze, H., Elo, K., Puhakka, L., Vanhatalo, A. & Jaakkola, S. 2017. The effect of additives on the quality of white lupin-wheat silage assessed by fermentation pattern and qPCR quantification of clostridia. *Grass and Forage Science* 72: 757–771.
- Le Dréan, G., Mounier, J., Vasseur, V., Arzur, D., Habrylo, O. & Barbier, G. 2010. Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. *International Journal of Food Microbiology* 138: 100–107.
- Leong, D. T., Gupta, A., Bai, H. F., Wan, Q., Yoong, L. F., Too, H-P., Chew, F. T. & Hutmacher, D. W. 2007. Absolute quantification of gene expression in biomaterials research using real-time PCR. *Biomaterials* 28: 203–210.

- Madigan, M. T. & Martinko, J. M. 2009. Brock Mikrobiologie. 11. uudistettu painos. München, Saksa: Pearson Studium, 1203 s.
- Masco, L., Vanhouette, T., Temmermann, R., Swings, J. & Huys, G. 2007. Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and *recA* genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products. *International Journal of Food Microbiology* 113: 351–357.
- McAllister, T.A., Dunière, L., Drouin, P., Xu, S., Wang, Y., Munns, K. & Zaheer, R. 2018. Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. *Journal of Dairy Science* 101: 4060–4074.
- McDonald, P., Henderson, A. R. & Heron, J. E. 1991. The Biochemistry of Silage. 2. painos. Marlow, Bucks, Englanti: Chalcombe publications, 340 s.
- Morandi, S., Cremonesi, P., Silvetti, T., Castiglioni, B. & Brasca, M. 2015. Development of a triplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium sporogenes* and *Clostridium tyrobutyricum* in milk. *Anaerobe* 34: 44–49.
- Muck, R. E. 2010. Silage microbiology and its control through additives. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39(supl. especial): 183–191.
- Muck, R. E. 2013. Recent advantages in silage microbiology. *Agricultural and Food Science* 22: 3–15.
- Nair, J., McAllister, T.A., Duniere, L., Xu, S., Drouin, P., Chevaux, E., Zaheer, R., Munns, K., Smiley, B., Rutherford, W., Qi, S. & Wang, Y. 2018. Molecular techniques to develop additives and characterize the microbial ecology of silages. Teoksessa: Gerlach, K. & Südekum, K.-H. (toim.). XVIII International Silage Conference 2018 (Proceedings of the XVIII International Silage Conference 24–26 July 2018, Bonn, Germany). Bad Breising, Germany: OundZ GmbH. s. 104–116.
- Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Oude Elferink, S. J. W. H. & Spoelstra, S. F. 2003. Microbiology of Ensiling. Teoksessa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.) Agronomy 42. Silage Science and Technology. Madison, Wisconsin, USA: ASA, CSSA & SSSA. s. 31–93.
- Park, R. S., Agnew, R. E. & Porter, M. G. 2005. Recent developments in methods to characterize the chemical and biological parameters of grass silage. Teoksessa: Park, R. S. & Stronge, M. D. (toim.) Silage Production and Utilisation (Proceedings of the XIVth international silage conference, a satellite workshop of the XXth international

- grassland congress, july 2005, Belfast, Northern Ireland). Wageningen, Alankomaat: Wageningen academic publishers. s. 109–119.
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J. & Sohier, D. 2011. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology* 28: 848–861.
- Rammer, C. 1996. Manure in grass silage production – Effects on silage fermentation and its hygienic quality. *Maataloustieteiden väitöskirja*. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Agriculture. 47 s.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B. & Moorman, A. F. M. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* 37: e45.
- Rook, A. J., Dhanoa, M. S. & Gill, M. 1990. Prediction of the voluntary intake of grass silages by beef cattle. 2. Principle component and ridge regression analyses. *Animal Production* 50: 439–454.
- Rooke, J.A. & Hatfield, R.D. 2003. Biochemistry of ensiling, Teoksessa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.) *Agronomy* 42. Silage Science and Technology. Madison, Wisconsin, USA: ASA, CSSA & SSSA. s. 95–139.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350–1354.
- Spoelstra, S. F. 1983. Inhibition of clostridial growth by nitrate during the early phase of silage fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34: 154–152.
- Stevenson, D. K., Muck, R. E., Shinnors, K. J. & Weimer, P. J. 2006. Use of real time PCR to determine population profiles of individual species of lactic acid bacteria in alfalfa silage and stored corn stover. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 329–338.
- Stoddard, S. F., Smith, B. J., Hein, R., Roller, B. R. K. & Schmidt, T. M. 2015. *rrnDB*: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Research* 43: D593–D598.
- Tabacco, E., Piano, S., Cavallarin, L., Bernardes, T. F. & Borreani, G. 2009. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. *Journal of Applied Microbiology* 107: 1632–1641.
- Tuomi, J. M., Voorbraak, F., Jones, D. L. & Ruijter, J. M. 2010. Bias in the  $C_q$  value

- observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. *Methods* 50: 313–322.
- Virtanen, A. I. 1933. The AIV method of processing feeds. *Empire Journal of Experimental Agriculture* 1: 143–155.
- Vissers, M. M. M., Driehuis, F., Te Giffel, M. C., De Jong, P. & Lankveld, J. M. G. 2007. Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. *Journal of Dairy Science* 90: 928–936.
- Vissers, M. M. M., Driehuis, F., Te Giffel, M. C., De Jong, P. & Lankveld, J. M. G. 2007b. Minimizing the level of butyric acid bacteria spores in farm tank milk. *Journal of Dairy Science* 90: 3278–3285.
- Wang, H., Hao, W., Ning, T., Zheng, M. & Xu, C. 2018. Characterization of culturable yeast species associating with whole crop corn and total mixed ration silage. *Asian-Australian Journal of Animal Science* 31: 198–207.
- Weiss, K. 2017. Volatile organic compounds in silage – effects of management factors on their formation: a review. *Slovak Journal of Animal Science* 50: 55–67.
- Wilkinson, J. M., Bolsen, K. K. & Lin, C. J. 2003. History of Silage. Teoksessa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.). *Agronomy 42. Silage Science and Technology*. Madison, Wisconsin, USA: ASA, CSSA & SSSA. s. 1–30.
- Wilkinson, J.M. & Muck, R.E. 2018. The future of ensiling: challenges and opportunities. Teoksessa: Gerlach, K. & Südekum, K.-H. (toim.). XVIII International Silage Conference 2018 (Proceedings of the XVIII International Silage Conference 24–26 July 2018, Bonn, Germany). Bad Breising, Germany: OundZ GmbH. s. 2–15.
- Wittwer, C. P., Herrmann, M. G., Moss, A. A. & Rasmussen, R. P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22: 130–138.
- Woolford, M. K. 1984. *The Silage Fermentation*. New York, USA: Marcel Dekker, inc. 350 s.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, F., Schleifer, K.-H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R. & Roselló-Móra, R. 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* 12: 635–64.

## 9. Liitteet

### Liite 1. Yleisimmät nurmisäilörehussa tavattavat homelajit.

Home		Viittaukset
<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	O'Brien et al. 2008. Grass and Forage Science 63: 121-137. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full</a> Driehuis 2013. Agricultural and Food and Science 22: 16-34. <a href="http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699">http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699</a> Storm et al. 2008. Stewart Postharvest Review 4: 1-12. <a href="http://www.researchgate.net/publication/233487781_Mycotox-ins_in_silage">http://www.researchgate.net/publication/233487781_Mycotox-ins_in_silage</a> Auerbach, Oldenburg, Weissbach 1998. Journal of the Science of Food and Agriculture 76: 565-572. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199804%2976:4%3C565::AID-JSFA990%3E3.0.CO;2-6/epdf">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199804%2976:4%3C565::AID-JSFA990%3E3.0.CO;2-6/epdf</a> Cheli et al. 2013. Animal feed Science and Technology 183: 1-16. <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643</a> Jonsson et al. 1990. Animal Feed Science and Technology 31: 139-155
	<i>Penicillium paneum</i>	O'Brien et al. 2008. Grass and Forage Science 63: 121-137. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full</a> Driehuis 2013. Agricultural and Food and Science 22: 16-34. <a href="http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699">http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699</a>
	<i>Schizophyllum commune</i>	O'Brien et al. 2008. Grass and Forage Science 63: 121-137. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full</a> Jonsson et al. 1990. Animal Feed Science and Technology 31: 139-155
	<i>Fusarium culmorum</i>	O'Brien et al. 2008. Grass and Forage Science 63: 121-137. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full</a> Driehuis 2013. Agricultural and Food and Science 22: 16-34. <a href="http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699">http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699</a> Cheli et al. 2013. Animal feed Science and Technology 183: 1-16. <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643</a>
<i>Cladosporium</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	Driehuis 2013. Agricultural and Food and Science 22: 16-34. <a href="http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699">http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699</a> O'Brien et al. 2008. Grass and Forage Science 63: 121-137. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full</a>
	<i>Alternaria</i>	O'Brien et al. 2008. Grass and Forage Science 63: 121-137. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full</a> Cheli et al. 2013. Animal feed Science and Technology 183: 1-16. <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643</a>
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	O'Brien et al. 2008. Grass and Forage Science 63: 121-137. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full</a> Auerbach, Oldenburg, Weissbach 1998. Journal of the Science of Food and Agriculture 76: 565-572. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199804%2976:4%3C565::AID-JSFA990%3E3.0.CO;2-6/epdf">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199804%2976:4%3C565::AID-JSFA990%3E3.0.CO;2-6/epdf</a> Driehuis 2013. Agricultural and Food and Science 22: 16-34. <a href="http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699">http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699</a> Storm et al. 2008. Stewart Postharvest Review 4: 1-12. <a href="http://www.researchgate.net/publication/233487781_Mycotox-ins_in_silage">http://www.researchgate.net/publication/233487781_Mycotox-ins_in_silage</a>



<i>Arthrinium</i>	<i>Arthrinium phaeospermum</i>	Cheli et al. 2013. Animal feed Science and Technology 183: 1-16. <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643</a> Jonsson et al. 1990. Animal Feed Science and Technology 31: 139-155
<i>Trichoderma</i>		O'Brien et al. 2008. Grass and Forage Science 63: 121-137. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full</a>
<i>Coprinus</i>		O'Brien et al. 2008. Grass and Forage Science 63: 121-137. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full</a>
<i>Mucor</i>		Auerbach, Oldenburg, Weissbach 1998. Journal of the Science of Food and Agriculture 76: 565-572. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199804%2976:4%3C565::AID-JSFA990%3E3.0.CO;2-6/epdf">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199804%2976:4%3C565::AID-JSFA990%3E3.0.CO;2-6/epdf</a> Cheli et al. 2013. Animal feed Science and Technology 183: 1-16. <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643</a>
<i>Scopulariopsis</i>		Cheli et al. 2013. Animal feed Science and Technology 183: 1-16. <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643</a>
<i>Monascus</i>		Auerbach, Oldenburg, Weissbach 1998. Journal of the Science of Food and Agriculture 76: 565-572. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199804%2976:4%3C565::AID-JSFA990%3E3.0.CO;2-6/epdf">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199804%2976:4%3C565::AID-JSFA990%3E3.0.CO;2-6/epdf</a> Cheli et al. 2013. Animal feed Science and Technology 183: 1-16. <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643</a>
	<i>Monascus ruber</i>	Driehuis 2013. Agricultural and Food and Science 22: 16-34. <a href="http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699">http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699</a>
<i>Byssoschlamys</i>		Cheli et al. 2013. Animal feed Science and Technology 183: 1-16. <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643</a>
<i>Geotrichum</i>		Auerbach, Oldenburg, Weissbach 1998. Journal of the Science of Food and Agriculture 76: 565-572. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199804%2976:4%3C565::AID-JSFA990%3E3.0.CO;2-6/epdf">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199804%2976:4%3C565::AID-JSFA990%3E3.0.CO;2-6/epdf</a> Cheli et al. 2013. Animal feed Science and Technology 183: 1-16. <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840113000643</a>
<i>Neotyphodium</i>	<i>Neotyphodium lolii</i>	Driehuis 2013. Agricultural and Food and Science 22: 16-34. <a href="http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699">http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699</a>
	<i>Neotyphodium coenophialum</i>	Driehuis 2013. Agricultural and Food and Science 22: 16-34. <a href="http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699">http://ojs.tsv.fi/index.php/AFS/article/view/6699</a>

---

## Liite 2. Yleisimmät nurmisäilörehussa tavattavat hiivalajit.

Hiiva	Viittaukset
<i>Pichia</i>	Jonsson et al. 1990. Animal Feed Science and Technology 31: 139-155
<i>Pichia fermentans</i>	O'Brien et al. 2008. Grass and Forage Science 63 (1): 121-137. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full</a>
<i>Pichia anomala</i>	O'Brien et al. 2008. Grass and Forage Science 63 (1): 121-137. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full</a>
<i>Geotrichum</i>	Jonsson et al. 1990. Animal Feed Science and Technology 31: 139-155
<i>Geotrichum candidum</i>	O'Brien et al. 2008. Grass and Forage Science 63 (1): 121-137. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full</a>
<i>Candida</i>	Jonsson et al. 1990. Animal Feed Science and Technology 31: 139-155
<i>Candida boidinii</i>	O'Brien et al. 2008. Grass and Forage Science 63 (1): 121-137. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full</a>
<i>Candida lambica</i>	O'Brien et al. 2008. Grass and Forage Science 63 (1): 121-137. <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2494.2007.00620.x/full</a>
	Jonsson et al. 1990. Animal Feed Science and Technology 31: 139-155

Lite 3. Alukesekvensit.

Species	Forward primer	Reverse primer	Length of amplification (nt)	Dye	Reaction volume (ul)	Thermocycler	Thermo-Cycling (°C and t)	Number of cycles	Reference	Link to reference
<i>Penicillium roqueforti</i>	IT'Sroq1F 5'ACCCGAA CTCTGTCTGA AG-3'	IT'Sroq1R 5'ATTTCGCT GCGTTCTTCA TC-3'	106	SYBR Green	15	Bio-Rad Mini Opticon	95 °C for 3 min; 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min and 72 °C for 15 s.	40	Le Drian et al. 2010. International Journal of Food Microbiology 138: 100-107.	<a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509006655">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509006655</a>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	NL1 primer 5'- GCATATCAA TAAGCGGAG GAAA AG-3'	260R 5'- TTAGCTTTAG ATGRARTTT ACCAAC-3'		SYBR Green	20	Mastercycler ep realplex	95 °C for 5 min; 95 °C for 10 s, 60 °C for 35 s.	40	Ferris et al. 2013. American Journal of Veterinary Research 74: 161-165.	<a href="http://avmajournals.avma.org/doi/full/10.2460/ajvr.74.1.161">http://avmajournals.avma.org/doi/full/10.2460/ajvr.74.1.161</a>
<i>Pichia anomala</i> ( <i>Hansenula anomala</i> )	Anom2F 5'-GTT AAA ACC TTT AAC CAA TA-3'	AGK-R 5'-AAA TGA CGC TCA AAC A-3'		SYBR Green	25		94 °C for 5 min; 94 °C for 1 min, 51 °C for 30 s and 72 °C for 1 min.	30	Tofalo et al. 2012. Food Control 23: 356-362.	<a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511003057?hpid=hp">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511003057?hpid=hp</a>
<i>Candida boidinii</i>	80.44-IF 5'- GTGGTGATG AACGACACT TTTCG-3'	80.44-IR 5'- AGCAAAAGC CCATAACTC CAAC-3'	135	SYBR ROX	20	Mastercycler ep realplex	95 °C for 2 min; 95 °C for 20 s, 60 °C for 20 s and 68 °C for 20 s; 68 °C for 15 s and 95 °C for 15 s.	40	Ultee et al. 2013. South African Journal of Enology & Viticulture 34: 68-78.	<a href="http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=17ad7cf9-bbcd45d4-9d91-e29262c45c1e%40sessionmgr4003&amp;vid=1&amp;hid=4207">http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=17ad7cf9-bbcd45d4-9d91-e29262c45c1e%40sessionmgr4003&amp;vid=1&amp;hid=4207</a>

Species	Forward primer	Reverse primer	Length of amplification (nt)	Dye	Reaction volume (ul)	Thermocycler	Thermo-Cycling (°C and t)	Number of cycles	Reference	Link to reference
<i>Penicillium, Aspergillus, Fusarium</i>	ITS-1F 5'-GGC ATC GAT GAA GAA CGC AGC-3'	ITS-1R 5'-CCT ACC TGA TCC GAG GTC AAC-3'	300	SYBR Green	20	MX 3000P QPCR system (Stratagene)	95°C for 10 min; 95°C for 30 s, 60°C for 2 min; final cycle 95°C for 1 min, 60°C for 2 min 95°C for 30 s.	40	Suanthie et al. 2009. Journal of Stored Products Research 45: 139–145.	<a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022474X09000125">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022474X09000125</a>
<i>Fusarium graminearum</i> (polyketide synthase gene PKS13)	ZEA-F 5'- CTGAGAAAT ATCGCTACA CTACCGAC-3'	ZEA-R 5'- CCCACCTCAG GTTGATTTC GTC-3'	192	SYBR Green	25	iCycler iQ5™ Real Time PCR Detection System	95°C for 4 min; 94°C for 45 s, 60°C for 45 s, 72°C for 45 s, 80°C for 10 s and final extension at 72°C for 7 min.	40	Atoui et al. 2012. International Journal of Food Microbiology 154: 59–65.	<a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511007343">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511007343</a>
<i>Fusarium culmorum</i>	ZEA-F 5'- CTGAGAAAT ATCGCTACA CTACCGAC-3'	ZEA-R 5'- CCCACCTCAG GTTGATTTC GTC-3'	192	SYBR Green	25	iCycler iQ5™ Real Time PCR Detection System	95°C for 4 min; 94°C for 45 s, 60°C for 45 s, 72°C for 45 s, 80°C for 10 s and final extension at 72°C for 7 min.	40	Atoui et al. 2012. International Journal of Food Microbiology 154: 59–65.	<a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511007343">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511007343</a>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AFKS1 5'-GCC TGG TAG TGA AGC TGA GGC T-3'	AFKS2 5'-CGG TGA ATG TAG GCA TGT TGT CC-3'		Taq Man		LightCycler 480 detection system	50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min; then 50 cycles of 95 °C for 15 s and 65 °C or 60 °C for 1 min.	50	Melloul et al. 2014. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 37: 271–279.	<a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014795711400040X">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014795711400040X</a>

**FKS probe 5'-6-FAM-TCA CTC TCT ACC CCC ATG CCC GAG CC-BHQ1-3'**



Species	Forward primer	Reverse primer	Length of amplification (nt)	Dye	Reaction volume (ul)	Thermocycler	Thermo-cycling (°C and t)	Number of cycles	Reference	Link to reference
<i>Fusarium culmorum</i>	culmorum MGB-F 5'-TCACCCAAAG ACGGGAATG A-3'	culmorum MGB-R 5'-GAACGCTGC CCTCAAGCT T-3'		Taq Man	30	ABI Prism 7700 apparatus	50 °C for 2 min; 95 °C for 10 min; 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min.	40	Waalwijk et al. 2004. Eur. J. Plant Pathology 110: 481-494.	<a href="http://link.springer.com/article/10.1023/B%3AEJPP.0000032387.52385.1">http://link.springer.com/article/10.1023/B%3AEJPP.0000032387.52385.1</a>
<i>Fusarium graminearum</i>	graminearum MGB-F 5'-GGCGCTTCT CGTGAACAC A-3'	graminearum MGB-R 5'-TGGCTAAAC AGCAGGAAT GC-3'		Taq Man	30	ABI Prism 7700 apparatus	50 °C for 2 min; 95 °C for 10 min; 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min.	40	Waalwijk et al. 2004. Eur. J. Plant Pathology 110: 481-494.	<a href="http://link.springer.com/article/10.1023/B%3AEJPP.0000032387.52385.1">http://link.springer.com/article/10.1023/B%3AEJPP.0000032387.52385.1</a>
<i>Fusarium graminearum</i> (Target gene Tri5, trichodiene synthase)	graminearum Tri5 forward 5'-TCTTAACACT AGCGTGCGC CTTCT-3'	graminearum Tri5 reverse 5'-CATGCCAAC GATTGTTTG GAGGGA-3'	193	Taq Man	21	iCycler iQ realtime PCR machine (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Calif., U.S.A.)	95°C for 3 min; 95°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s.	60	Vegi et al. 2013. Journal of Food Science 78 (1): 70-76.	<a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2012.03008.x/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2012.03008.x/full</a>
General fungal ITS	Probe for Tri5 F5'-TCCGTAGGTG AACCTGCGG-3'	Probe for Tri5 R5'-TCCTCCGCTT ATTGATATGC -3'	550-600			PCR	94°C for 1 min; 58/68°C for 1 min; 72°C for 1 min	32	Glass and Donaldson 1995. Applied and Environmental Microbiology 61 : 1323-1330.	<a href="http://aem.asm.org/content/61/4/1323.abstract?sid=3e092cf9-1273-4e53-93ab-deab6d389bd0">http://aem.asm.org/content/61/4/1323.abstract?sid=3e092cf9-1273-4e53-93ab-deab6d389bd0</a>

Species	Forward primer	Reverse primer	Length of amplification (nt)	Dye	Reaction volume (ul)	Thermocycler	Thermo-cycling (°C and t)	Number of cycles	Reference	Link to reference
General mold	F5'-	R5'-	500			PCR	94°C for 1 min; 58/68°C for 1 min; 72°C for 1 min	32	Glass and Donaldson 1995, Applied and Environmental Microbiology 61: 1323-1330.	<a href="http://aem.asm.org/content/61/4/1323.abstract?sid=3e092ce9-1273-4e53-93ab-deab6d389bd0">http://aem.asm.org/content/61/4/1323.abstract?sid=3e092ce9-1273-4e53-93ab-deab6d389bd0</a>
BTLA	TTCGCCCGTC	TTCATGTTGA ACTC-3'								
General bacterial E8/E1115	F5'- AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG -3'	R5'- AGGGTTGGGC TCGTTG-3'	1000			PCR	94°C for 2 min; 94°C for 1 min; 55°C for 1 min; 72°C for 1 min	30	Baker et al. 2003, Journal of Microbiological Methods 55: 541–555.	<a href="https://core.ac.uk/download/pdf/2632842.pdf">https://core.ac.uk/download/pdf/2632842.pdf</a>
<i>Geotrichum candidum</i>	F5'- GATAATTCTT GTGAATTGCA GAA GTGA-3'	R5'- TTGATTCGAA ATTTAGAAG AGCAA-3'		Taq Man	25	ABI Prism 7700 Sequence Detection instrument	95°C for 10 min; 95°C for 15 s; 50°C for 2 min; 60°C fro 1 min	40	Haugland et al. 1999, Molecular and Cellular Probes 13: 329-340.	<a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089085089990258X">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089085089990258X</a>
<i>Candida albicans</i>	<b>Probe GeoP1</b> 5'-CAATTCCAGAGAGAAACAACGCTCAAACAAG-3' F5'- CTTGGTATTT TGCATGTTGC TCTC-3'	R5'- GTCAGAGGCT ATAACACACA GCAG-3'		Taq Man		ABI Prism 7700 Sequence Detection instrument	95°C for 10 min; 95°C for 15 s; 50°C for 2 min; 60°C for 1 min	40	Brinkman et al. 2003, Applied and Environmental Microbiology 69: 1775-1782.	<a href="http://aem.asm.org/content/69/3/1775.full">http://aem.asm.org/content/69/3/1775.full</a>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<b>Probe CalbP1</b> 5'-TTTACCGGGCCAGCATCGGTTT-3' F5'- ATCGAATTTT TGAACGCACA TTG-3'	R5'- CGCAGAGAA ACCTCTCTTT GGA-3'	175	SYBR Green	25	ABI Prism 5700 Sequence Detection system	95°C for 10 min; 95°C for 15 s; 60°C for 1 min; 72°C for 30 s	40	Hierro et al. 2007, Federation of European Microbiological Societies Yeast Research 7: 1340–1349.	<a href="https://academic.oup.com/femsyr/article/7/8/1340/549435">https://academic.oup.com/femsyr/article/7/8/1340/549435</a>